

TESIS DOCTORAL

**PROBIÓTICOS Y SUS DERIVADOS:
Una alternativa para el tratamiento de la
hipercolesterolemia**

Programa Oficial de Doctorado en
Nutrición Humana

Memoria presentada por
Ana Isabel Sañudo Otero

Para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Granada

Granada, marzo 2016



ugr

Universidad
de Granada



**BIOSEARCH
LIFE**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Ana Isabel Sañudo Otero
ISBN: 978-84-9125-914-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43859>

La doctoranda **Ana Isabel Sañudo Otero** y los directores de la tesis **Óscar Bañuelos Hortigüela** y **Emilio Martínez de Victoria Muñoz**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo presentado en ella ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 3 de marzo de 2016.

Director/es de la Tesis

Doctorando

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: Óscar Bañuelos Hortigüela

A handwritten signature in blue ink, featuring a prominent circular loop at the top and a horizontal stroke below it.

Fdo.: Ana Isabel Sañudo Otero

A handwritten signature in blue ink, with a vertical stroke on the left and a horizontal stroke at the bottom.

Fdo.: Emilio Martínez de Victoria Muñoz

A mi Familia,
Apoyo constante desde la distancia

*“Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar”*

A. Machado

Agradecimientos

Durante esta etapa me han acompañado personas que de forma directa o indirecta han contribuido a la culminación de este trabajo y a las que estoy enormemente agradecida.

Gracias a Biosearch S.A., por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en sus instalaciones concediéndome una beca, así como a la Fundación General UGR-Empresa por mediar dicha beca.

A mis directores de tesis Dr. Óscar Bañuelos y Dr. Emilio Martínez de Victoria, por su profesionalidad y ayuda. Gracias Óscar por haber confiado en mí e iniciarme en este mundo de la investigación.

A todo el departamento de Investigación. A la Dra. Mónica Olivares, por su ayuda en momentos críticos. A Juristo, que siempre se acuerda de mi tierra. A Mari Paz, por estar ahí cuando he necesitado consejo. A Carlos y Antonio, por todo su cariño. A Jose, porque nadie te comprende mejor que otro tesista, ¡ánimo!, que ya va quedando menos. A Roberto, por echarme un cable cuando lo he necesitado. Gracias compañeros por toda vuestra ayuda.

A todo el departamento de Bioprocesos. A Alberto, por la gran cantidad de cultivos de mi "*pequeña reuteri*" que he necesitado. A María, por esas muestras tan bien rotuladas y a Yanis, por sus bromas, esas que quitan el hipo. Sois unos vecinos estupendos.

A la Dra. Raquel Criado, por su ayuda, consejos y apoyo dentro del laboratorio; y por ser una estupendísima guía de montaña, gracias por la cantidad de excursiones y rinconcitos de la sierra que me has enseñado.

A Juan Antonio, siempre dispuesto a ayudar. A Álvaro, por esa alegría con la que irrumpe en nuestro laboratorio cada vez que tiene que hacer un ELISA. A Julio, que aunque ya no andes por aquí, siempre estás dando ánimos.

Al resto de compañeros de la empresa, por todas las muestras de afecto y por todos los ánimos que me habéis dado a lo largo de todo este tiempo. Muchas gracias a todos.

A mi “*lab-mate*” favorito, ¡gracias Lluís!, ¡qué hubiera hecho yo sin ti!, sin nuestras semanas musicales, sin la *playlist* de los lunes, ¡ni la de los viernes! Gracias por poner banda sonora a toda esta etapa, por mostrarme lo mejor de Granada, por los buenos ratos y, sobre todo, por tu amistad.

To my English speakers, Chia, Tracy, and Willow, for making me laugh with their crazy stories and adventures.

A mis compis biotecnólogos y algún que otro acoplado: Alicia, Estefanía, Javi y Miguel, que entre quedadas y visitas habéis conseguido que León y Granada no estén tan lejos. Y en especial a Andoni, por ser mi gran confidente, por tus buenos consejos y por tu ayuda.

A mis palentinas: Alejandra, Irene, María, María Jesús, Marta y Patri. Porque siempre puedo contar con vosotras, sois uno de los tesoros más valiosos que tengo. ¡Ah! Y antes de que se me olvide, mis células también os agradecen toda vuestra preocupación por ellas durante todo este tiempo.

A mi familia, que siempre ha estado pendiente desde la distancia, que si esto acabaría algún día, pues parece que sí, que se acerca el momento. Una pena no haberlo hecho antes y así habérselo contado, cara a cara, a dos de las personas que me han cuidado y enseñado desde que tengo memoria, mis abuelos Úrsula y Juan, no os olvido. Y a mis numerosos tíos y primos que han estado pendientes de mis avances todo este tiempo, gracias por todos vuestros ánimos.

Por último, agradecer a mis padres su apoyo incondicional, su sacrificio y todo su cariño. Y a mis hermanos, Beatriz y Manuel, os quiero, formamos un gran equipo.

Muchas gracias a todos.

Índice

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. El colesterol	3
1.1.1. Funciones del colesterol	3
1.1.2. Fuentes de colesterol.....	6
1.1.3. Lipoproteínas	12
1.1.4. Transporte de colesterol.....	14
1.1.5. Transporte reverso de colesterol.....	20
1.1.6. Regulación de la biosíntesis de colesterol	22
1.1.7. Homeostasis de colesterol	24
1.1.8. Excreción de colesterol	28
1.1.9. Modelos de estudio del metabolismo del colesterol.....	31
1.2. Hipercolesterolemia.....	32
1.2.1. Tratamientos de la hipercolesterolemia	33
1.3. Probióticos	39
1.3.1. Generalidades de los probióticos.....	40
1.3.2. Selección de bacterias con capacidad probiótica	42
1.3.3. Probióticos para el tratamiento de la hipercolesterolemia	45
Capítulo 2. Objetivos	53
Capítulo 3. Materiales y Métodos	57
3.1. Reactivos químicos de uso general	59
3.2. Oligonucleótidos y plásmidos	59
3.3. Microorganismos	61
3.3.1. Cepas bacterianas que componen la colección de muestras	61
3.3.2. Otras cepas bacterianas.....	61
3.4. Cultivo de microorganismos	63
3.4.1. Medios de cultivo bacterianos.....	63
3.4.2. Crecimiento de cepas bacterianas	66

3.5. Creación de la colección de muestras	66
3.5.1. Cultivo de las cepas bacterianas que componen la colección de muestras	67
3.5.2. Preparación de la colección de muestras	70
3.5.3. Preparación de las muestras para ensayos de actividad hipocolesterolémica	71
3.6. Cultivos celulares.....	74
3.6.1. Líneas celulares	74
3.6.2. Condiciones y medios de cultivo	75
3.7. Búsqueda de muestras con actividad hipocolesterolémica.....	76
3.7.1. Puesta a punto y protocolo para la medida de actividad colesterol esterasa	76
3.7.2. Protocolo y puesta a punto para la medida de actividad hidrolasa de sales biliares (HSB).....	80
3.7.3. Medida de la citotoxicidad de las muestras de la colección	82
3.7.4. Cuantificación de la inhibición de la absorción de fluoresterol en enterocitos	83
3.8. Citometría.....	85
3.8.1. Citometría para análisis de células eucariotas	85
3.8.2. Citometría para análisis de bacterias	85
3.9. Microscopía.....	86
3.9.1. Microscopía de fluorescencia en cultivos celulares	86
3.9.2. Microscopía confocal	86
3.9.3. Microscopía electrónica	87
3.10. Manipulación de ácidos nucleicos	87
3.10.1. Extracción de ARN	87
3.10.2. Retrotranscripción.....	89
3.10.3. Aislamiento de ADN genómico bacteriano	90
3.10.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	90
3.11. Hibridación substractiva	93
3.11.1. Aislamiento de ARN _{total}	93
3.11.2. Síntesis de ADNc de doble hebra	93
3.11.3. Digestión con la enzima <i>Rsa</i> I	95
3.11.4. Unión de adaptadores.....	95

3.11.5. Primera hibridación	95
3.11.6. Segunda hibridación	95
3.11.7. Primera amplificación mediante PCR del producto de las hibridaciones	96
3.11.8. Segunda amplificación mediante PCR del producto de las hibridaciones	97
3.12. Ligación de moléculas de ADN	97
3.13. Transformación de <i>E. coli</i> y obtención de ADN plasmídico	98
3.13.1. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	98
3.13.2. Detección de colonias portando plásmidos recombinantes	99
3.13.3. Minipreparaciones de ADN plasmídico (<i>minipreps</i>)	100
3.14. Purificación de extractos de proteínas	100
3.15. Electroforesis de macromoléculas.....	100
3.15.1. Electroforesis de ARN	100
3.15.2. Electroforesis de ADN	101
3.15.3. Electroforesis de proteínas	101
3.16. Transferencia de macromoléculas.....	103
3.16.1. Transferencia de ADN mediante vacío (<i>Southern blot</i>).....	103
3.16.2. Transferencia directa de ADN mediante sistema de vacío (<i>Dot blot</i>).....	104
3.17. Hibridación de ácidos nucleicos	104
3.17.1. Marcaje de las sondas.....	104
3.17.2. Prehibridación e hibridación	105
3.17.3. Detección	105
3.18. Detección de peptidoglicano	106
3.19. Detección de bacteriófagos	107
3.19.1. Aislamiento de bacteriófagos y extracción de ADN	107
3.19.2. Detección de placas de lisis.....	109
3.19.3. Inducción de fase lítica con mitomicina C.....	109
3.20. Modelos de experimentación <i>in vivo</i>	110
3.21. Análisis estadístico	111

Capítulo 4. Resultados y Análisis.....	113
4.1. Ensayos de inhibición de la enzima colesterol esterasa	116
4.2. Ensayos de actividad hidrolasa de sales biliares.....	118
4.3. Ensayos de citotoxicidad.....	119
4.4. Ensayos de inhibición de absorción de fluoresterol en líneas celulares	122
4.4.1. Puesta a punto del ensayo <i>in vitro</i> para estudiar la absorción de fluoresterol.....	122
4.5. Análisis de la capacidad de reducir la absorción de fluoresterol por las muestras de la colección	134
4.6. Búsqueda del mecanismo de acción	139
4.6.1. Análisis de la degradación del fluoresterol	141
4.6.2. Actividad hidrolasa de sales biliares (HSB).....	142
4.6.3. Transportador de membrana <i>Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)</i>	144
4.6.4. Captación del fluoresterol/colesterol por la cepa probiótica	149
4.7. Adquisición de la capacidad de captar fluoresterol	154
4.7.1. Tiempo de incubación de cultivos de <i>L. reuteri</i> CECT 8605.....	156
4.7.2. Composición del medio de cultivo	157
4.7.3. Efecto del pH	159
4.8. Caracterización de <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 8605	165
4.8.1. Características bioquímicas de <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 8605.....	167
4.8.2. Análisis genético de <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 8605	170
4.8.3. Detección de bacteriófagos en <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 8605	175
4.8.4. Especificidad de la expresión génica en función del pH en cepas de <i>L. reuteri</i> ...	176
4.9. Estudio de la actividad <i>in vivo</i> de <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 8605 y <i>Bifidobacterium breve</i> CECT 8606 en un modelo animal	179
Capítulo 5. Discusión	185
5.1. Inhibición de la enzima colesterol esterasa.....	188
5.2. Hidrólisis de sales biliares	189

5.3. Validación del método experimental	190
5.4. Búsqueda de cepas probióticas y derivados con capacidad de inhibir la absorción de colesterol.....	192
5.5. Mecanismo de acción de <i>L. reuteri</i> CECT 8605 y <i>B. breve</i> CECT 8606.....	195
5.6. Localización celular del fluoresterol captado por <i>L. reuteri</i> CECT 8605 y <i>B. breve</i> CECT 8606	199
5.7. Activación de la capacidad de <i>L. reuteri</i> CECT 8605 de captar fluoresterol.	201
5.8. Caracterización de la capacidad de <i>L. reuteri</i> CECT 8605 para captar fluoresterol	204
5.9. Capacidad de <i>B. breve</i> CECT 8606 de captar fluoresterol.....	207
5.10 Actividad hipocolesterolémica <i>in vivo</i> de <i>L. reuteri</i> CECT 8605 y <i>B. breve</i> CECT 8606.....	208
Capítulo 6. Conclusiones	215
Bibliografía	219
Anexo.....	247

Capítulo 1. Introducción

1.1. El colesterol

El colesterol pertenece a un amplio grupo de sustancias denominadas esteroides. Los esteroides constituyen una clase de lípidos derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado ciclopentanoperhidrofenantreno. Los anillos de ciclohexano fusionados poseen una conformación de “silla”, lo cual hace que la estructura del colesterol sea voluminosa y rígida, con un solo grupo hidroxilo que genera una pequeña polaridad en un extremo, que lo hace ser una sustancia débilmente anfipática (Figura 1.1). Sin embargo, parte del colesterol presente en las membranas ha adquirido un carácter más hidrófobo a causa de la esterificación del grupo hidroxilo con un ácido graso (Mathews et al., 2002).

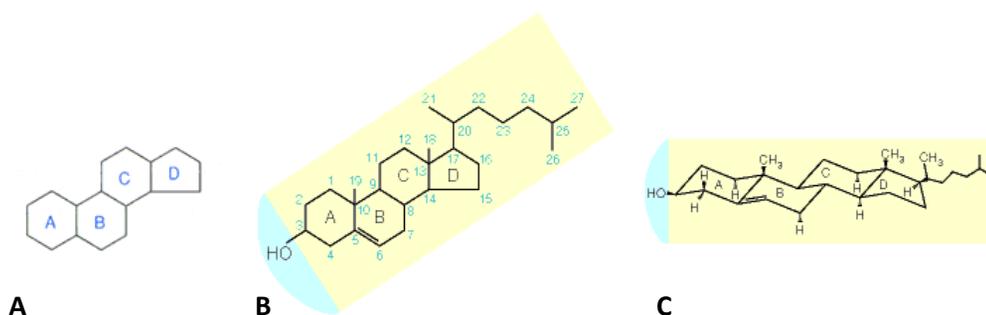


Figura 1.1. (A) Sistema de identificación de anillos del hidrocarburo tetracíclico saturado ciclopentanoperhidrofenantreno. (B) Fórmula estructural del colesterol y sistema de numeración de los átomos de carbono. (C) Modelo esquelético de colesterol (Mathews et al., 2002).

1.1.1. Funciones del colesterol

Una de las funciones principales del colesterol es estructural, puesto que se intercala entre los fosfolípidos de las membranas biológicas, contribuyendo al mantenimiento de su permeabilidad y estabilidad, constituyendo también el 20-25 % de

los lípidos que forman parte de dichas membranas (Hannaoui et al., 2014). Además, influye en la biosíntesis de las membranas y en el crecimiento celular (Yeagle, 1985).

El colesterol juega un papel crucial en la formación de microdominios llamados balsas de lípidos (*lipid rafts*), regiones claves para señales de transducción y transmisión sináptica (Tsui-Pierchala et al., 2002). De hecho, a pesar de que el cerebro es aproximadamente el 2-5 % de la masa corporal, es donde reside alrededor del 25 % del colesterol total, siendo un órgano altamente enriquecido en colesterol contrastándolo con el resto de tejidos, que poseen aproximadamente 2 mg de colesterol por gramo de tejido, en comparación con los 15-20 mg de colesterol por gramo en el caso del sistema nervioso central (Dietschy y Turley, 2004).

El colesterol es precursor de una gran variedad de moléculas biológicamente activas, como las hormonas esteroideas (hormonas sexuales, glucocorticoides y mineralocorticoides) y la vitamina D (Tabas, 2002). Además, también es precursor de ácidos biliares (Javitt, 1994) y oxisteroles (Björkhem, 2009), moléculas que, como se detallará más adelante, participan en la excreción y homeostasis, respectivamente, del colesterol corporal (Figura 1.2).

Además, la ruta de biosíntesis de colesterol se ramifica hacia la biosíntesis de otras moléculas esenciales no esteroides. Estos intermediarios, que surgen a partir de la ruta del mevalonato, poseen un papel importante en la modificación post-traducciona de múltiples proteínas involucradas en la señalización intracelular, esenciales para el crecimiento y diferenciación celular, expresión de genes, glicosilación de proteínas y ensamblaje del citoesqueleto. Algunos ejemplos son el dolicol, hemo A y la coenzima Q (Buhaescu y Izzedine, 2007; Figura 1.2).

1.1.2. Fuentes de colesterol

El colesterol presente en los tejidos animales posee dos orígenes: la biosíntesis endógena y la absorción del colesterol procedente de la dieta.

1.1.2.1. Vía endógena

El colesterol es sintetizado por casi todas las células de animales vertebrados, principalmente en el hígado. La primera fase de la ruta, comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA. Esta molécula reacciona con una nueva molécula de acetil-CoA para dar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que se reduce mediante la enzima HMG-CoA reductasa a mevalonato. La ruta, en la que participan más de 20 enzimas, se resume en la figura 1.2 y tiene lugar en el retículo endoplasmático, citoplasma y peroxisomas de las células (Bloch y Rittenberg, 1942; Faust y Kovacs, 2014).

La enzima HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.88 y EC 1.1.1.34; formas dependientes de NADH y NADPH respectivamente), que cataliza la reacción dirigida hacia la biosíntesis del colesterol, es el principal punto de control de toda la ruta (Rodwell et al., 1976). Como se detallará más adelante (ver apartado 1.1.6), la síntesis de esta enzima está regulada por la concentración de colesterol presente en la célula.

1.1.2.2. Vía exógena

La asimilación del colesterol presente en la dieta, única fuente de este metabolito en animales invertebrados, se produce en el ser humano en el intestino. La absorción de colesterol, entendida como la transferencia de esta molécula desde el lumen intestinal hasta la linfa, consta de tres etapas: la primera es la solubilización micelar del colesterol (fase intraluminal), la segunda etapa consiste en su transporte a través de la membrana del enterocito (fase mucosa) y la tercera fase incluye la esterificación del colesterol dentro del enterocito y su incorporación en quilomicrones (fase intracelular; Turley, 2008; Wilson y Rudel, 1994; Figura 1.3).

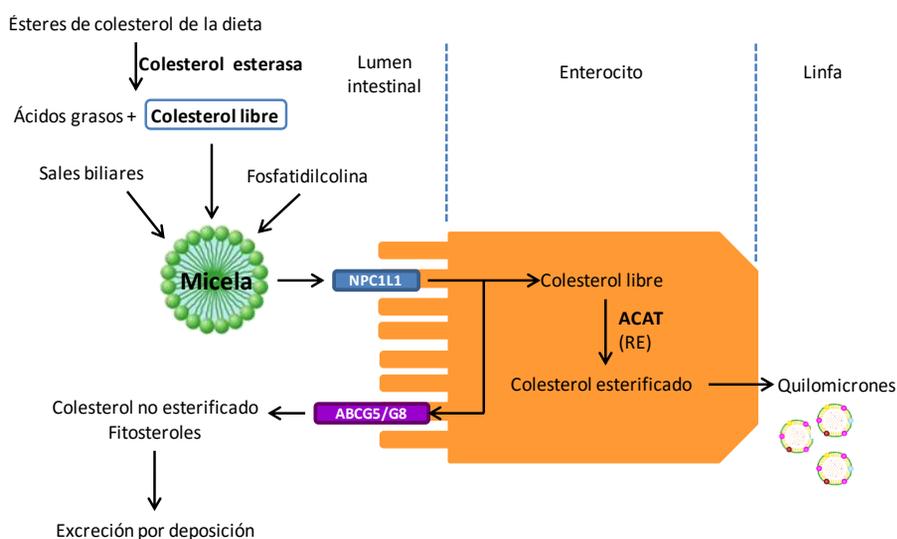


Figura 1.3. Proceso de absorción de colesterol exógeno. NOTA: ACAT = acetil-coenzima A acetiltransferasa, RE = Retículo endoplasmático.

Fase intraluminal

El colesterol presente en los alimentos se encuentra en forma de colesterol libre y de ésteres de colesterol (10-15 %). Esta fracción de colesterol esterificado debe ser hidrolizado por la enzima colesteroles esterasa (EC 3.1.1.13) secretada por el páncreas, previamente a su absorción (Figura 1.4.A). El producto de esta carboxil éster lipasa pancreática, el colesterol libre, aunque sigue teniendo una baja solubilidad en medio acuoso, es capaz de solubilizarse en un complejo esférico formado por fosfolípidos y ácidos biliares de la bilis, denominado micela, lo que permite su interacción con la membrana de las células epiteliales del intestino (enterocitos; Ros, 2000).

Las micelas se forman de manera espontánea en el lumen del intestino delgado cuando se alcanza una determinada concentración de sales biliares, fosfatidilcolina y colesterol, y permiten el transporte de moléculas hidrofóbicas (colesterol y otros esteroides, ácidos grasos y monoglicéridos) en el medio acuoso del contenido intestinal (Iqbal y Hussain, 2009). El colesterol incorporado en dichas micelas no solo procede de la dieta sino también de la bilis, de la propia secreción intestinal y de la descamación de células epiteliales. La solubilización micelar del colesterol presente en el lumen intestinal

permite su difusión a través de la barrera mucosa que recubre la superficie de las microvellosidades intestinales (Woollett et al., 2006; Yao et al., 2002). Una vez en esta localización, y tras su disgregación, los monómeros de colesterol quedan disponibles para ser captados por el enterocito.

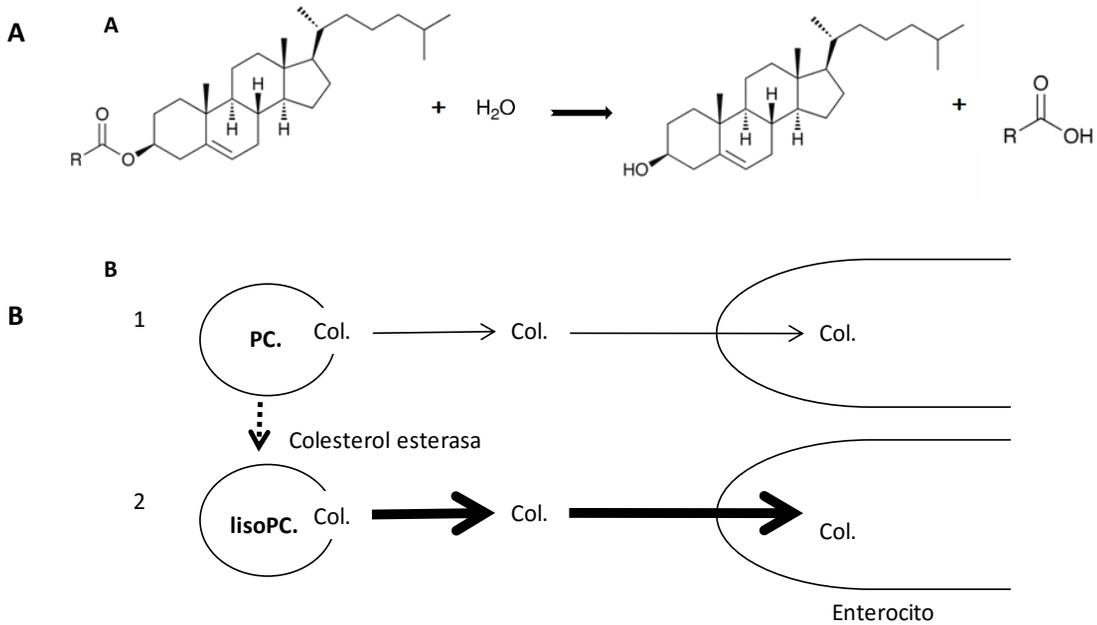


Figura 1.4. (A) Reacción de hidrólisis de los ésteres de colesterol por la enzima coolesterol esterasa. (B) Efecto de la enzima coolesterol esterasa sobre el proceso de absorción de colesterol presente en micelas: (1) El colesterol (Col) tiene gran afinidad por las micelas formadas por fosfatidilcolina (PC), lo que conlleva una menor liberación de monómeros de colesterol y, por tanto, menor absorción de éste. (2) Cuando la PC de la micela es hidrolizada a lisofosfatidilcolina (LisoPC) mediante la acción de la enzima coolesterol esterasa, la micela es más débil, lo que permite una mayor liberación de monómeros de colesterol (Ikeda et al., 2002).

Enzima Colesterol Esterasa pancreática

La enzima colesterol esterasa, secretada por el páncreas, eleva sus niveles en el duodeno como respuesta a la grasa presente en la dieta, y es ahí donde cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos. La actividad de esta enzima es esencial para la absorción del colesterol que procede de la dieta (Iqbal y Hussain, 2009). A pesar de que, como hemos dicho previamente, sólo el 10-15 % del colesterol que se ingiere está esterificado, cuando esta enzima es bloqueada, la absorción de este compuesto disminuye un 80 % (Gallo et al., 1984). Este efecto se debe a que esta enzima no solo actúa sobre ésteres de colesterol, sino que también hidroliza la fosfatidilcolina presente en las micelas en las que se encuentra el colesterol, dando lugar a lisofosfatidilcolina. Esta modificación debilita la membrana de la micela y permite un mayor acceso del colesterol al borde del enterocito, aumentando gracias a ello su absorción (Figura 1.4.B; Hamada et al., 2005; Ikeda et al., 2002).

Fase mucosa

La segunda fase del proceso de absorción de colesterol procedente de la dieta, comprende su paso desde el lumen intestinal al citoplasma de los enterocitos a través del ribete en cepillo del epitelio. Aunque también existe difusión pasiva del colesterol, la mayoría de este compuesto y de otros esteroides es transportada de forma activa al interior del enterocito mediante la proteína *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1), situada en las microvellosidades del enterocito (Davis y Altmann, 2009). Aunque la superficie intestinal capaz de absorber colesterol es amplia, la mayor parte se produce en el duodeno y yeyuno proximal (Lammert y Wang, 2005).

Proteína transportadora intestinal *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1)

Los transportadores NPC1L1 son proteínas de membrana implicadas en la absorción de colesterol. Poseen un extremo amino terminal conservado y glicosilado, un dominio detector de esteroides (SSD, *Sterol-Sensing Domain*) rico en cisteínas, y 13 dominios transmembrana (Figura 1.5; Iyer et al., 2005; Wang y Song, 2012). Esta proteína se encuentra, en elevada concentración, en la membrana apical de los

enterocitos (Altmann et al., 2004), aunque también puede encontrarse en estructuras de membrana intracelulares (Davies et al., 2005). Además de en enterocitos, NPC1L1 también se encuentra en células de otros tejidos, como el hígado, donde, a pesar de que se desconoce su función exacta, se cree que participa en la homeostasis del colesterol (Pramfalk et al., 2010).

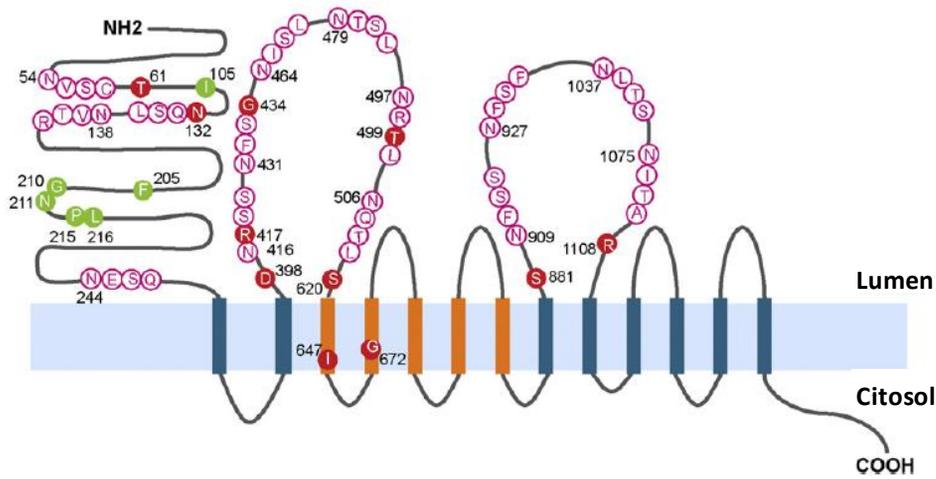


Figura 1.5. Estructura secundaria de la proteína NPC1L1 humana. La zona naranja en la región transmembrana indica el dominio detector de esteroides (SSD), los círculos rosas las glicosilaciones, los indicados en rojo mutaciones responsables de un descenso de la absorción de colesterol y los círculos verdes zonas con gran afinidad para unirse al colesterol (Wang y Song, 2012).

El hallazgo de esta proteína de membrana como factor clave en la internalización del colesterol, llegó tras varios estudios infructuosos de inactivación de genes sospechosos de estar implicados en la absorción de colesterol, hasta que Altmann y colaboradores (Altmann et al., 2004), tras realizar un análisis bioinformático de genes expresados en tejido intestinal, con posibles secuencias relacionadas con el transporte de colesterol, identificaron el transportador NPC1L1. Además, observaron una elevada expresión de este gen en el yeyuno en comparación con otros tejidos. La importancia del transportador NPC1L1, en la absorción de colesterol en el intestino, se confirmó con un descenso en dicha absorción, hasta aproximadamente un 70 %, en ratones *knockout* en este transportador (Altmann et al., 2004; Davis et al., 2004).

El transporte del colesterol al interior del enterocito comienza con la interacción entre el colesterol y la región SSD de la proteína NPC1L1, produciéndose un cambio conformacional en el transportador y la internalización del complejo NPC1L1-colesterol, por endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina (Ge et al., 2008). La clatrina se fija a la membrana plasmática por medio de proteínas adaptadoras: el complejo AP-2. Este último complejo interactúa con la clatrina estimulando su polimerización y generando una malla de clatrina que cubre toda la vesícula (Pearse et al., 2000). Una vez que la vesícula de clatrina se encuentra dentro de la célula, las proteínas de la cubierta se separan dando lugar a un endosoma temprano sobre el cual interactúa la proteína GTPasa Rab5 (Davies et al., 2005). Dicha proteína participa en la fusión de endosomas tempranos entre sí y en el direccionamiento de los endosomas hasta el endosoma de reciclaje, con la ayuda de microfilamentos de miosina (Figura 1.6; Ge et al., 2008). Desde el endosoma de reciclaje, el colesterol es enviado al retículo endoplasmático, mientras que el receptor NPC1L1 se recicla volviendo a la membrana plasmática a través de un complejo de microfilamentos compuesto por miosina y diversas proteínas Rab (Chu et al., 2009).

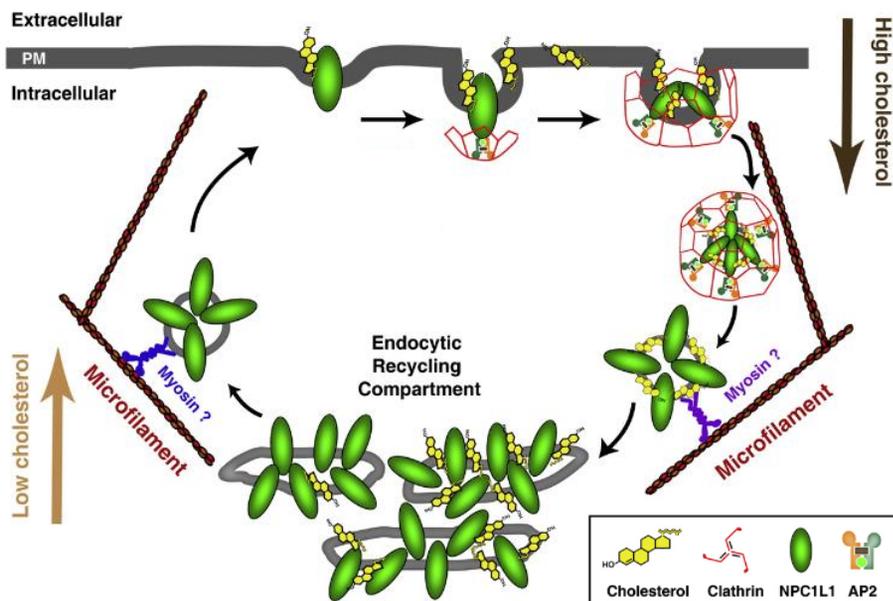


Figura 1.6. Internalización de colesterol mediada por la proteína NPC1L1. La proteína NPC1L1 sufre un proceso de reciclaje entre la membrana plasmática y el endosoma de reciclaje (*Endocytic Recycling Compartment*), que depende de los niveles de colesterol extra e intracelular (Ge et al., 2008).

Fase intracelular

El colesterol captado por el enterocito puede ser devuelto de nuevo al lumen intestinal por medio de los transportadores ABCG5/G8 (Yu et al., 2002a) o difundir hasta el retículo endoplasmático y ser re-esterificado por la enzima acilCoA:colesterol aciltransferasa-2 (ACAT-2; Lee et al., 2000). El paso final en el proceso de absorción de colesterol es su incorporación, junto con una pequeña proporción de colesterol libre, a quilomicrones nacientes, en asociación con triglicéridos y apoproteínas, y su liberación al sistema linfático (Figura 1.3).

1.1.3. Lipoproteínas

Debido a su insolubilidad en medio acuoso, el colesterol es transportado a través de los fluidos biológicos formando parte, junto a fosfolípidos y proteínas, de lipoproteínas. Simplificando, podemos decir que las distintas lipoproteínas ejercen la misma función que las micelas en el contenido intestinal: permitir el transporte de colesterol.

Las lipoproteínas son agregados esféricos con una capa externa hidrosoluble que contiene fosfolípidos, colesterol libre y proteínas de transporte lipídico (apolipoproteínas o apoproteínas), y una parte interna insoluble con triglicéridos y ésteres de colesterol. La clasificación estándar de las lipoproteínas incluye, por orden creciente de densidad: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, *Intermediate Density Lipoprotein*), lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoprotein*) y lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*). Cada tipo de lipoproteína tiene un tamaño y composición química diferente (Tabla 1.1).

Las distintas lipoproteínas poseen una composición lipídica distintiva y contienen apoproteínas características, que intervienen en las interacciones de las lipoproteínas con los tejidos. En las lipoproteínas humanas se encuentran un total de nueve apolipoproteínas principales. Sus propiedades se resumen en la tabla 1.2.

Tabla 1.1. Propiedades de las principales clases de lipoproteínas plasmáticas humanas (Mead et al., 1986; Vance y Vance, 1985).

	Quilomicrones	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidad (g/mL)	< 0,95	0,950-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Composición (%)					
Proteínas	2	8	15	22	40-55
Triglicéridos	86	55	31	6	4
Colesterol libre	2	7	7	8	4
Colesterol esterificado	3	12	23	42	12-20
Fosfolípidos	7	18	22	22	25-30
Apoproteínas presentes	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II y C-III	B-100, C-I, C-II, C-III y E	B-100, C-I, C-II, C-III y E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D y E

Tabla 1.2. Apoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas humanas (Mead et al., 1986; Vance y Vance, 1985).

Apoproteína	PM	Características
A-I	28.300	Proteína principal de las HDL; activa la LCAT
A-II	17.400	Proteína principal de las HDL
B-48	241.000	Se encuentra exclusivamente en los quilomicrones
B-100	513.000	Proteína principal de las LDL
C-I	7.000	Se encuentra en los quilomicrones; activa la LCAT y la LPL
C-II	10.000	Se encuentra principalmente en las VLDL; activa LPL
C-III	9.300	Se encuentra principalmente en los quilomicrones, las VLDL y las HDL; inhibe la LPL
D	35.000	Proteína de las HDL, también denominada proteína de transferencia de ésteres de colesterol
E	33.000	Se encuentra en las VLDL, LDL y HDL

Nota: PM: peso molecular. LCAT = lecitina:colesterol aciltransferasa; LPL = lipoproteína lipasa.

Dado que los lípidos tienen una densidad mucho menor que las proteínas, el contenido lipídico de una clase de lipoproteínas está inversamente relacionado con su

densidad. Así, cuanto mayor es la abundancia de lípidos, menor es su densidad. Es por ello que altos niveles de LDL están asociados normalmente a elevada concentración de colesterol en sangre.

1.1.4. Transporte de colesterol

Como ya se comentó anteriormente (ver apartado 1.1.2.2), una vez que el colesterol se encuentra en el interior del enterocito, es llevado al retículo endoplasmático, donde se vuelve a esterificar por la acción de la enzima acilCoA:colesterol aciltransferasa-2 (ACAT-2; Lee et al., 2000). El colesterol esterificado es empaquetado en lipoproteínas grandes y esféricas enriquecidas en triglicéridos, denominadas quilomicrones. La superficie de los quilomicrones, cubierta de una monocapa de fosfolípidos y colesterol libre, se encuentra envuelta en apoproteína B-48 (apoB-48) y una pequeña porción de apoproteína A-I (apoA-I). Por el contrario, el núcleo de los quilomicrones se encuentra enriquecido en triglicéridos y ésteres de colesterol (Hussain, 2014; Wasan et al., 2008). La formación de los quilomicrones implica un proceso fisicoquímico en el que participa la proteína transferidora de triglicéridos de los microsomas (MTP, *Microsomal Triglyceride transfer Protein*). Una vez formados estos aglomerados lipídicos, son secretados a la circulación sistémica a través de la linfa (Gordon y Jamil, 2000), pasando a la sangre a través del conducto torácico. Es importante destacar el papel de ACAT-2 y MTP como un paso limitante y clave en la absorción de colesterol.

Por otro lado, el colesterol libre presente en el enterocito puede ser transferido a partículas HDL nacientes (compuestas por apoA-I, fosfolípidos y colesterol libre) a través del transportador ABCA1 (*ATP-Binding Cassette Protein A1*). Este proceso es clave en la homeostasis del colesterol y sitúa al intestino como uno de los órganos principales en la biogénesis de partículas HDL (Brunham et al., 2006).

Recapitulando lo explicado hasta el momento, una vez que el colesterol se introduce en el enterocito mediante el transportador NPC1L1, puede seguir varias vías:

(1) ser devuelto de nuevo al lumen intestinal mediante los transportadores ABCG5/G8, (2) salir al torrente sanguíneo formando parte de partículas HDL a través del transportador ABCA1 o (3) ser re-esterificado por la enzima ACAT-2 y salir formando parte de quilomicrones, mediante exocitosis, al vaso linfático para posteriormente pasar a la circulación general a través del canal torácico (Figura 1.7).

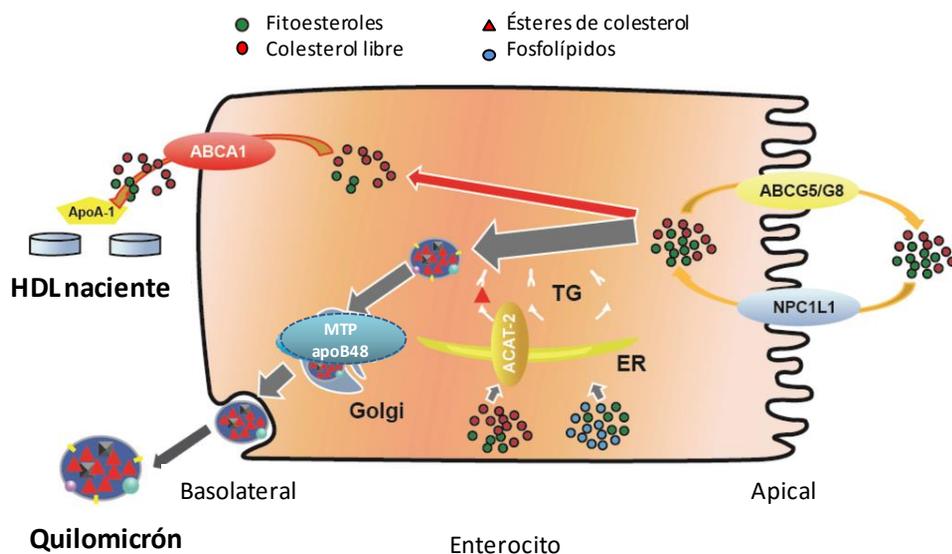


Figura 1.7. Posibles vías de salida del colesterol del enterocito: en forma de colesterol libre al lumen intestinal (vía ABCG5/G8) o al torrente sanguíneo (a través de ABCA1) y hacia el sistema linfático en forma de ésteres de colesterol incluidos en quilomicrones. NOTA: TG = Triglicéridos; ER = Retículo endoplasmático.

Una vez en la circulación sanguínea, los quilomicrones interactúan con partículas HDL maduras, realizándose un intercambio entre ambas. Los quilomicrones ceden fosfolípidos y colesterol libre a estas partículas gracias a la acción de la PLTP (*Phospholipid Transfer Protein*; proteína de transferencia de fosfolípidos; Lewis y Rader, 2005), además de apoA-I. Por otro lado, las partículas HDL ceden a los quilomicrones colesterol esterificado, proceso en el que participa la enzima CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*; proteína de transferencia de ésteres de colesterol; Chung et al., 2004), además de apoC y apoE, aunque este último mecanismo de transferencia no está del todo definido (Figura 1.8).

La función principal de los quilomicrones es el transporte de triglicéridos, principalmente al corazón, tejido adiposo y músculo esquelético, donde la enzima lipoproteín lipasa (LPL), localizada en la capa endotelial de dichos tejidos, hidroliza los triglicéridos presentes en los quilomicrones a ácidos grasos y glicerol (Kersten, 2014). Las apoproteínas apoC y apoA, presentes en los quilomicrones, juegan un papel crucial en la activación de dicha lipasa (Feingold y Grunfeld, 2000). Al ir disminuyendo el contenido en triglicéridos, los quilomicrones disminuyen su tamaño y se enriquecen en ésteres de colesterol, además de ceder gran parte de su contenido en apoC, debido a la actividad lipolítica de LPL. La nueva partícula generada se conoce con el nombre quilomicrón remanente o quilomicrón residual, y viaja hasta el hígado donde es reconocida, a través de apoE, por los receptores LDL y/o receptores hepáticos LRP (*LDL-related-protein*) para llevar a cabo su endocitosis (Figura 1.8; Cooper, 1997).

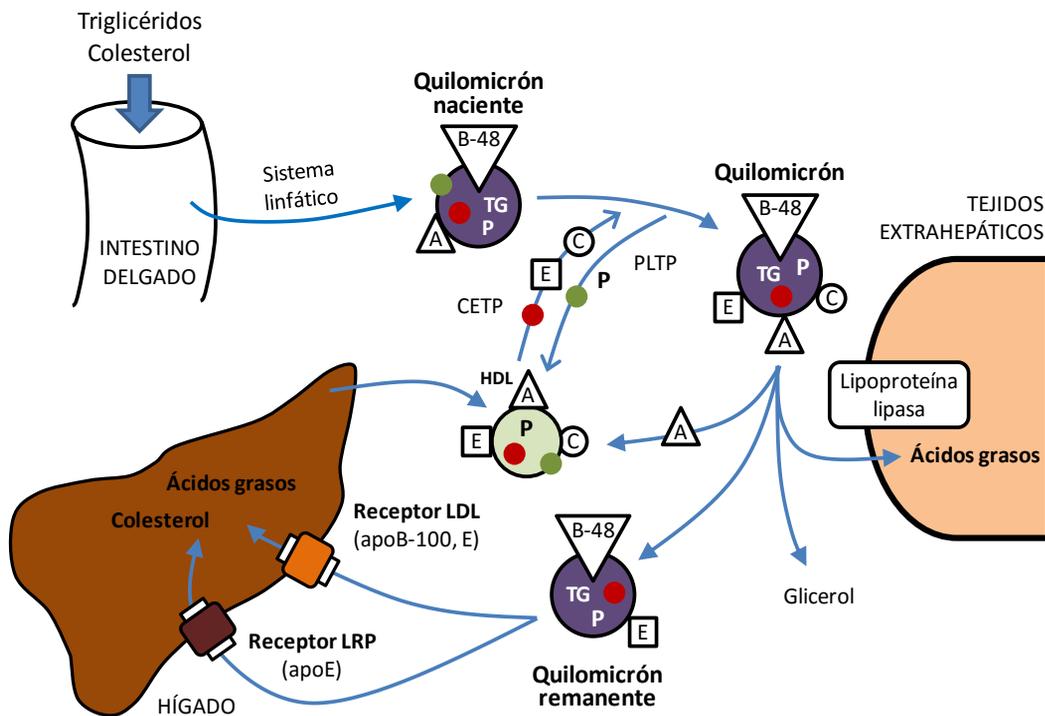


Figura 1.8. Destino metabólico de quilomicrones (Pertierra et al., 2001). NOTA: en círculos verdes (P) se representan los fosfolípidos y en rojos al colesterol esterificado. TG = Triglicéridos.

Por otro lado, las partículas VLDL desempeñan un papel muy parecido al de los quilomicrones, pero en este caso con los triglicéridos sintetizados en el hígado. Su síntesis se produce en el retículo endoplasmático, donde además se incorpora en ellas apoB-100. Posteriormente, en el aparato de Golgi, se incorporan apoproteínas tales como apoC y apoE (Hossain et al., 2014; Nestruck y Rubinstein, 1976). Por último, ya en el plasma, irán adquiriendo apoproteínas apoE y apoC-II a partir de partículas HDL, de forma similar a lo que sucede en los quilomicrones. Al igual que ocurre en los quilomicrones, apoC activa la enzima LPL, provocando la liberación de ácidos grasos, que son tomados por los tejidos periféricos, dando lugar a una lipoproteína cada vez más enriquecida en colesterol. Dicha partícula se designa como IDL (lipoproteína de densidad intermedia) e irá perdiendo nuevamente triglicéridos hasta convertirse en LDL (lipoproteína de baja densidad; Figura 1.9). A pesar de que la mayoría de partículas LDL derivan de las VLDL, existe una pequeña proporción de LDL que es directamente liberada por el hígado y también una pequeña porción de partículas VLDL que son reabsorbidas por el hígado sin ser transformadas en LDL (Havel, 1984).

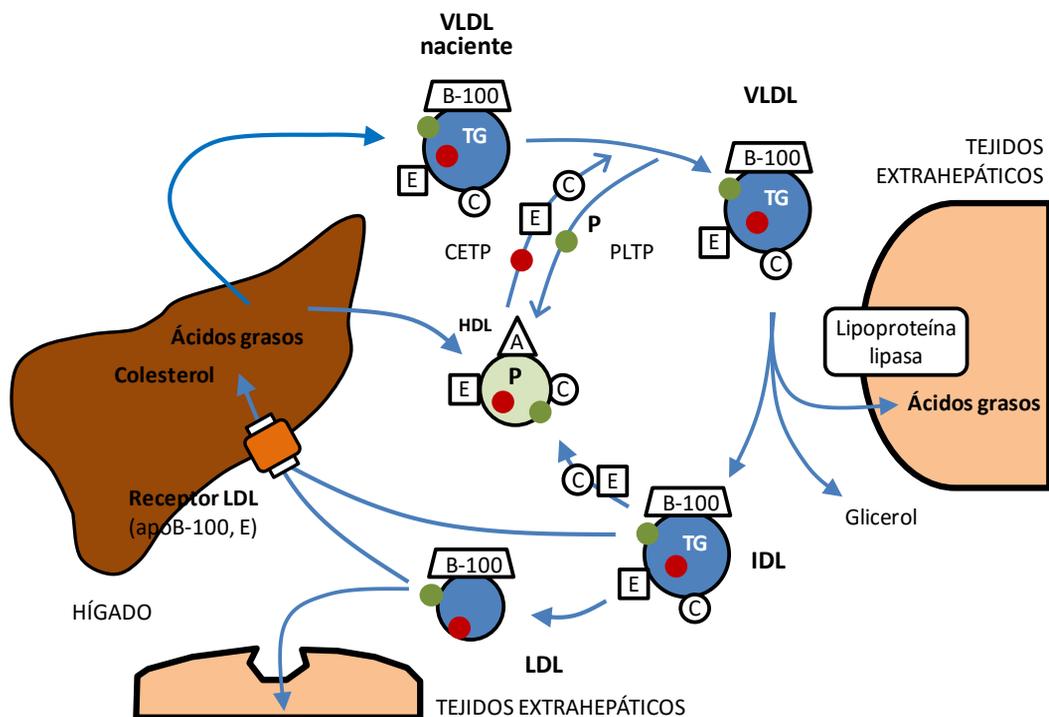


Figura 1.9. Metabolismo de VLDL y formación de LDL (Pertierra et al., 2001). NOTA: en círculos verdes (P) se representan los fosfolípidos y en rojos al colesterol esterificado. TG = Triglicéridos.

La composición de las partículas LDL se limita a ésteres de colesterol en su núcleo y apoB-100 en su revestimiento externo. Dichas partículas se encargan de la mayor parte del suministro de colesterol a los tejidos periféricos. Para ello, la partícula LDL interacciona con su receptor específico LDL localizado en la superficie celular y, una vez que se produce la unión entre el receptor LDL y apoB-100, la partícula es internalizada mediante endocitosis mediada por vesículas de clatrina. Ya en el interior de la célula, varias de estas vesículas se fusionan para formar un endosoma, que a su vez, se fusiona con un lisosoma, con lo que se pone al complejo LDL-receptor en contacto con las enzimas hidrolíticas del lisosoma. El receptor se recicla y vuelve a la membrana plasmática para captar más LDL, la apoproteína B-100 se hidroliza a aminoácidos, y los ésteres de colesterol son hidrolizados por la lipasa A o colesterol esterasa para dar colesterol libre, o bien serán re-esterificados con ácidos grasos y almacenados en pequeñas gotitas en el citosol de las células (Figura 1.10; Goedeke y Fernández-Hernando, 2011). La salida del colesterol del endosoma tardío/lisosoma necesita la intervención de dos proteínas: NPC1 y NPC2 (*Niemann-Pick disease* tipo C1 y C2), las cuales son cruciales para el movimiento del colesterol desde el compartimento lisosómico/endosómico tardío a diversos compartimentos intracelulares (Figura 1.11; Infante et al., 2008).

El colesterol internalizado ejerce 3 efectos regulatorios: (1) suprime la síntesis endógena de colesterol mediante la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, por represión de la transcripción del gen de esta enzima y por inducción de la degradación de la HMG-CoA reductasa presente en la célula, (2) activa la acilCoA:colesterol aciltransferasa (ACAT), fomentando el almacenamiento de los ésteres de colesterol y (3) regula la síntesis del propio receptor LDL, reduciendo su ARNm (Figura 1.10; Mathews et al. 2002).

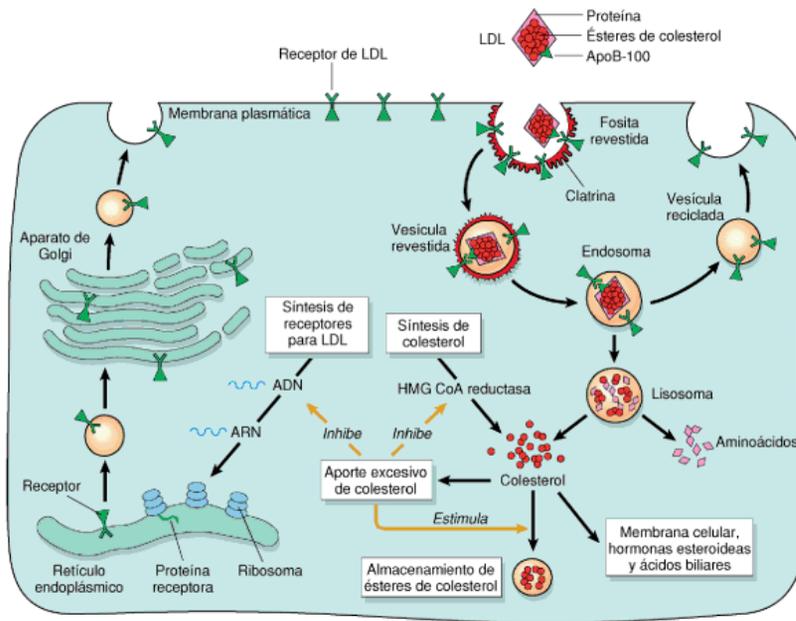


Figura 1.10. Absorción de LDL y regulación del metabolismo celular del colesterol (Kumar, 2010).

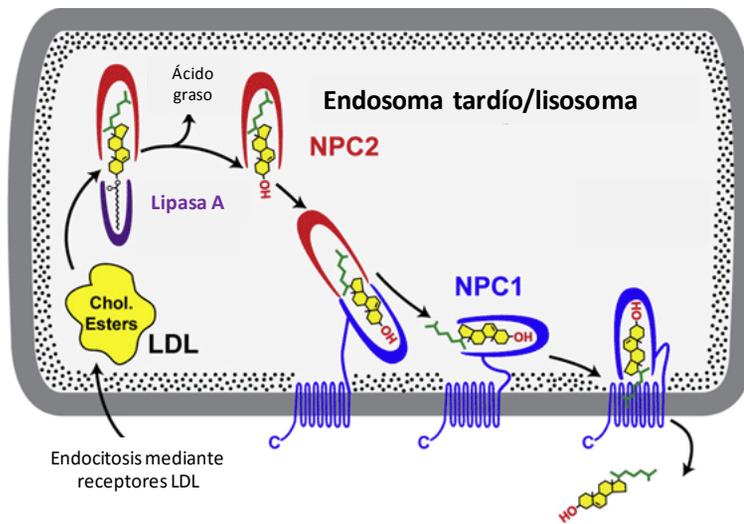


Figura 1.11. Tráfico celular de colesterol mediado por lisosomas.

A lo largo de todo el sistema de transporte de colesterol, se ha comentado varias veces la interacción de partículas HDL tanto con los quilomicrones como con las partículas VLDL. Las lipoproteínas HDL se sintetizan, como ya se comentó previamente,

en el intestino, pero también son sintetizadas en el hígado, y constituyen un reservorio plasmático de apoC y apoE. Además, se encargan del transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, proceso que se conoce como transporte reverso de colesterol.

1.1.5. Transporte reverso de colesterol

Esta ruta, compartida por varias especies de mamíferos (Dietschy et al., 1993), consiste en la transferencia de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, para posteriormente ser expulsado del organismo mediante excreción biliar (Lewis y Rader, 2005).

Los órganos generadores de las partículas HDL, hígado e intestino principalmente, secretan partículas HDL pobremente lipidadas (HDL naciente), compuestas por fosfolípidos y apoA-I. Al ser liberadas al plasma, captan colesterol libre procedente de los tejidos, que liberan colesterol mediante difusión pasiva o mediante el transportador ABCA1 (*ATP-binding cassette protein, subfamily A, member 1*; proteína cassette de unión a ATP tipo A1) presente en todas las células, incluidas los macrófagos (Lewis y Rader, 2005). La incorporación de colesterol esterificado a las partículas HDL la lleva a cabo la enzima LCAT (*Lecitin-cholesterol aciltransferasa*), activada por la apoA-I (Rader, 2009). En el torrente sanguíneo la enzima LCAT se encuentra preferiblemente unida a la superficie de las lipoproteínas HDL y convierte colesterol libre en ésteres de colesterol mediante la transferencia de ácidos grasos (Jonas, 2000).

Además, como ya se comentó previamente (ver apartado 1.1.4), los quilomicrones y lipoproteínas VLDL ceden fosfolípidos y colesterol libre a estas partículas gracias a la acción de la PLTP (*Phospholipid Transfer Protein*; proteína de transferencia de fosfolípidos; Figura 1.12).

La incorporación de colesterol esterificado a la lipoproteína HDL da como resultado partículas maduras, esféricas y de mayor tamaño, más organizadas

estructuralmente y capaces de recibir colesterol de las células a través de un nuevo canal perteneciente a la familia de las proteínas transportadoras ABC: el ABCG1 (Uehara y Saku, 2014). Además, y como ya se comentó en el apartado anterior, la acción de la CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*; proteína de transferencia de ésteres de colesterol), permite la transferencia de ésteres de colesterol desde las partículas HDL a los quilomicrones, VLDL e IDL. A cambio, las HDL reciben triglicéridos y colesterol no esterificado (Barter, 2000).

El transporte se completa mediante captación de las HDL por los receptores SR-BI hepáticos, gracias a la interacción con la lipasa pancreática o colesterol esterasa (Besler et al., 2012). Esta lipasa es responsable de la deslipidación y remodelación de las HDL, que pierden los triglicéridos y fosfolípidos, disociándose de nuevo en apoA-I y generando partículas de menor tamaño que iniciarán un nuevo ciclo (Figura 1.12).

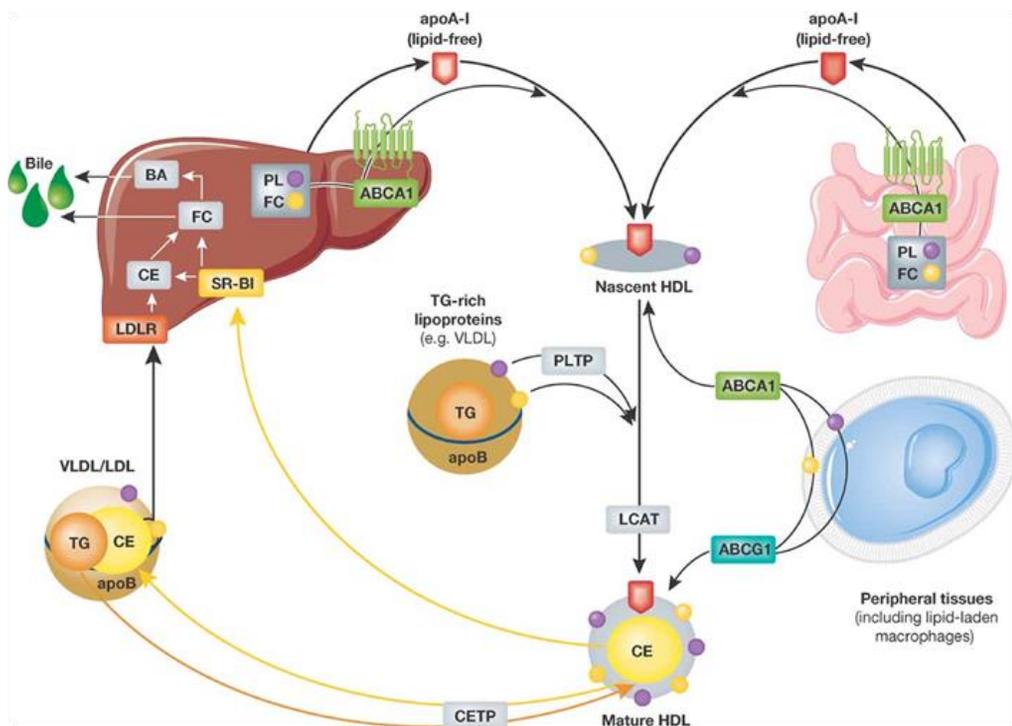


Figura 1.12. Transporte reverso de colesterol (Besler et al., 2012). Nota: BA = ácidos biliares, CE = colesterol esterificado, FC = colesterol libre, PL = fosfolípidos, TG = triglicéridos.

Una vez que el colesterol ha llegado al hígado y, puesto que el colesterol libre es potencialmente tóxico para las células, es esterificado por la enzima esteroil O-aciltransferasa 2 (SOAT2), que posee el mismo papel que la enzima ACAT2 en el intestino (Lopez et al., 2014), y es entonces almacenado en gotas lipídicas o destinado a formar las partículas VLDL, que saldrán al sistema circulatorio.

1.1.6. Regulación de la biosíntesis de colesterol

La síntesis de colesterol *de novo* está regulada por la concentración de colesterol presente en el retículo endoplasmático de las células, existiendo una relación indirecta entre la concentración de esta molécula en el retículo endoplasmático y los niveles plasmáticos de colesterol presentes en las lipoproteínas. Además, una elevada ingesta de colesterol mediante los alimentos conlleva un descenso de la síntesis endógena de colesterol (van der Wulp et al., 2013). Esta regulación se efectúa a nivel transcripcional y modulando la actividad HMG-CoA reductasa.

La regulación a nivel transcripcional es mediada por la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides: SREBP-2 (SREBP, *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*; Brown y Goldstein, 1997). SREBP-2 se localiza en el retículo endoplasmático (Figura 1.13, Tabla 1.4), donde forma parte de un complejo con otras dos proteínas reguladoras: SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*, proteína activadora a través de fragmentación de SREBP) e Insig-1 (proteína regulada por insulina). El descenso de colesterol en el retículo endoplasmático hace que la proteína Insig-1 se disocie del complejo SREBP-SCAP, permitiendo a dicho complejo migrar hasta el aparato de Golgi mediante vesículas COP II (Figura 1.13). Una vez que la proteína Insig-1 se disocia del complejo SREBP-SCAP es degradada y requiere ser sintetizada de nuevo, además de presencia de moléculas de colesterol para volver a unirse al complejo (Goldstein et al., 2006; Gong et al., 2006). En el aparato de Golgi, SREBP-2 es escindido, secuencialmente por S1P y S2P (proteasas del sitio 1 y 2, respectivamente) y es entonces cuando SREBP migra al núcleo celular y actúa de factor de transcripción uniéndose a SER (elemento regulador de esteroides), regulando la transcripción de genes relevantes no sólo en la

síntesis de colesterol sino también en la homeostasis celular de esteroides, como son el receptor de lipoproteínas de baja densidad (receptor LDL), la enzima HMG-CoA reductasa, SREBP-2 y la proteína Insig-1, que se incorpora de nuevo a la membrana del retículo endoplasmático cerrando el ciclo (DeBose-Boyd et al., 1999; Horton et al., 2002; Yang et al., 2002).

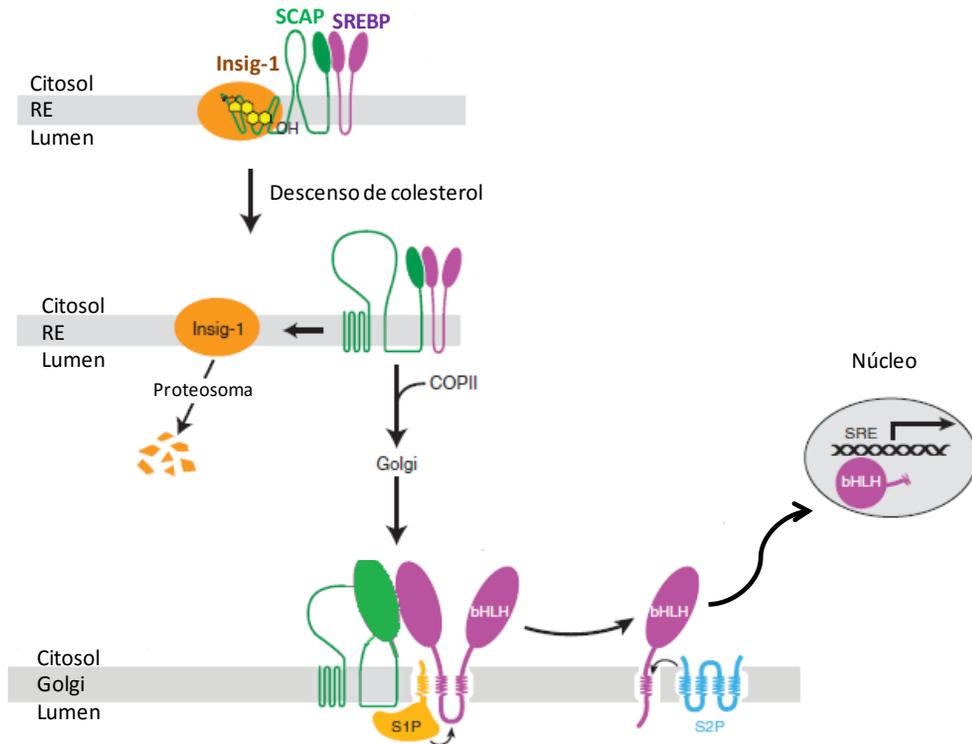


Figura 1.13. Activación de la síntesis de colesterol *de novo*.

Otro punto clave de la regulación de la síntesis de colesterol es la enzima HMG-CoA reductasa. Dicha enzima contiene un dominio sensible a esteroides al cual se une el lanosterol (primer intermediario cíclico de la ruta de síntesis de colesterol) o el oxisterol 25-hidroxicolesterol, lo que provoca un cambio conformacional, permitiendo la ubiquitinación y degradación de la enzima (Tabla 1.4; Song et al., 2005). Además, la actividad de dicha enzima depende de una vía de fosforilación/desfosforilación regulada por las hormonas insulina y glucagón. La insulina promueve la síntesis de colesterol mediante desfosforilación de la HMG-CoA reductasa, mientras que el glucagón

promueve la fosforilación y, por consiguiente, la inactivación de dicha enzima (Ness et al., 1994; Rodwell et al., 1976).

Estudios recientes, sugieren que la enzima escualeno monooxigenasa, que cataliza la primera etapa de oxigenación en la conversión de escualeno a escualeno 2,3-Epóxido en la ruta de biosíntesis de colesterol (Figura 1.2), podría ser un segundo punto de control de dicha ruta (Gill et al., 2011).

1.1.7. Homeostasis de colesterol

La homeostasis del colesterol integra la síntesis de colesterol *de novo* y de los receptores encargados de captar el colesterol desde la circulación sanguínea, el depósito de colesterol en las membranas y secreción de lipoproteínas, así como el almacenamiento intracelular de los ésteres de colesterol y metabolismo de oxisteroles, ácidos biliares y hormonas esteroideas de tal forma que el balance global del organismo se mantenga estable (Figura 1.14; Tabla 1.3). El proceso está regulado por factores endógenos y exógenos y depende del tipo de tejido.

Tabla 1.3. Balance de colesterol humano (Cohen, 2008).

	Colesterol (g/día)
Colesterol total en el cuerpo	35 g/70 kg de peso
Balance de colesterol diario	
Síntesis <i>de novo</i>	1 - 1,2
Ingerido mediante la dieta	0,2 - 0,4
Homeostasis de colesterol	
Síntesis de sales biliares	0,4
Vía secreción biliar de colesterol	
Como sales biliares	24
Reabsorbido	95 %
Como colesterol	2
Contenido de colesterol en intestino	2,4 (2 vía bilis + 0,4 mediante dieta)
Reabsorbido	50 %
Excreción fecal	1,6 (1,2 colesterol + 0,4 sales biliares)

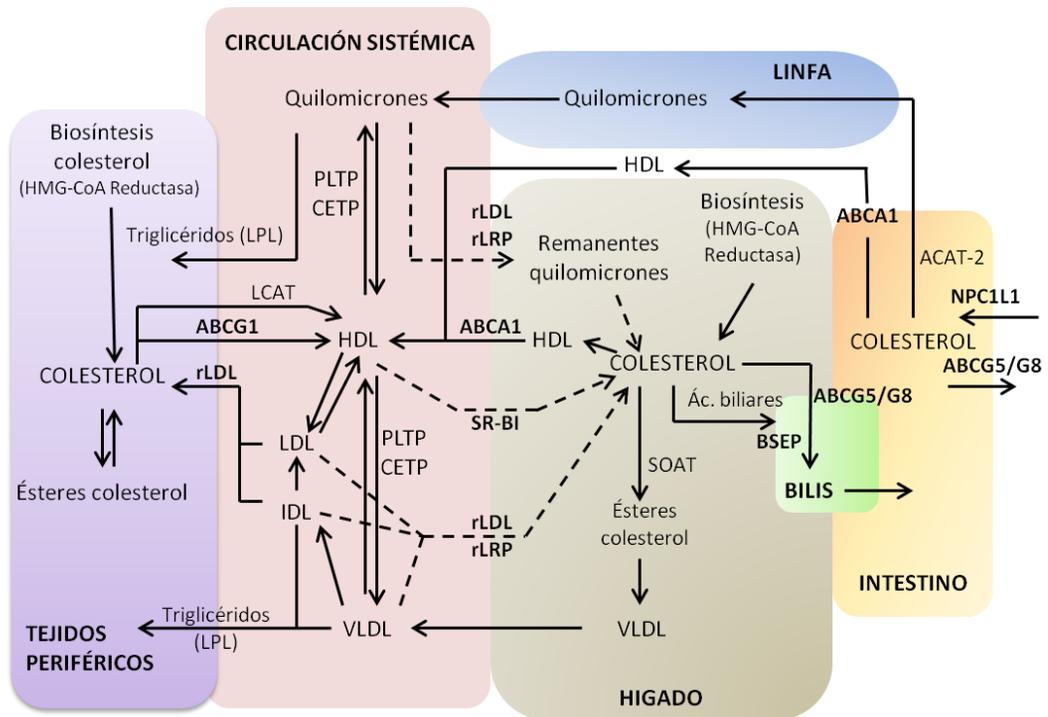


Figura 1.14. Homeostasis del colesterol.

En la figura 1.15 se resume la regulación del metabolismo del colesterol a nivel celular, desde la síntesis endógena de colesterol a partir de acetil-CoA a la captación de colesterol circulante mediante los receptores LDL. En respuesta a una concentración intracelular baja de colesterol, el complejo SCAP-SREBP se transporta desde el retículo endoplasmático (RE) al aparato de Golgi, para que SREBP sea procesado y se active la respuesta nuclear (ver apartado 1.1.6), la cual implica la activación de la ruta de síntesis endógena de colesterol (promovida por la acción de la enzima HMG-CoA reductasa) y el aumento de la toma de colesterol circulante por medio de receptores LDL (rLDL). Como hemos visto previamente, la presencia de rLDL en la superficie celular permite que las partículas LDL que transportan colesterol y ésteres de colesterol sean reconocidas, internalizadas y transportadas al interior de la célula por los endosomas/lisosomas, los cuales reciclan rLDL de nuevo a la membrana plasmática mientras que procesan el colesterol mediante NPC1 y NPC2 para conducirlo finalmente al RE (ver apartado 1.1.4). Tanto el colesterol sintetizado vía endógena, como el internalizado desde el torrente sanguíneo, es esterificado por la enzima ACAT y almacenado en pequeñas gotas lipídicas.

Por otro lado, en respuesta a un exceso de colesterol celular se generan oxisteroles (colesterol oxidado) que, además de reducir la síntesis de colesterol actuando sobre la HMG-CoA reductasa, sirven como ligandos de los receptores hepáticos X (LXR; *Liver X Receptor*; Björkhem, 2009; Gabbi et al., 2014). Dichos receptores se encuentran en hígado, tejido adiposo, intestino, riñón y macrófagos, y son importantes reguladores, a nivel de transcripción, de genes involucrados en la respuesta al exceso de colesterol. Una de estas respuestas es el aumento de proteínas ABCA1 y ABCG1, implicadas en el transporte reverso del colesterol (ver apartado 1.1.5), promoviendo por tanto la exportación de colesterol celular mediante apoA-I y HDL (Goedeke y Fernández-Hernando, 2011; Moore et al., 2010). Además, y como se detallará más adelante, los oxisteroles producto de la oxidación de colesterol, promueven la eliminación de este compuesto a través de la vía de excreción (ver apartado 1.1.8).

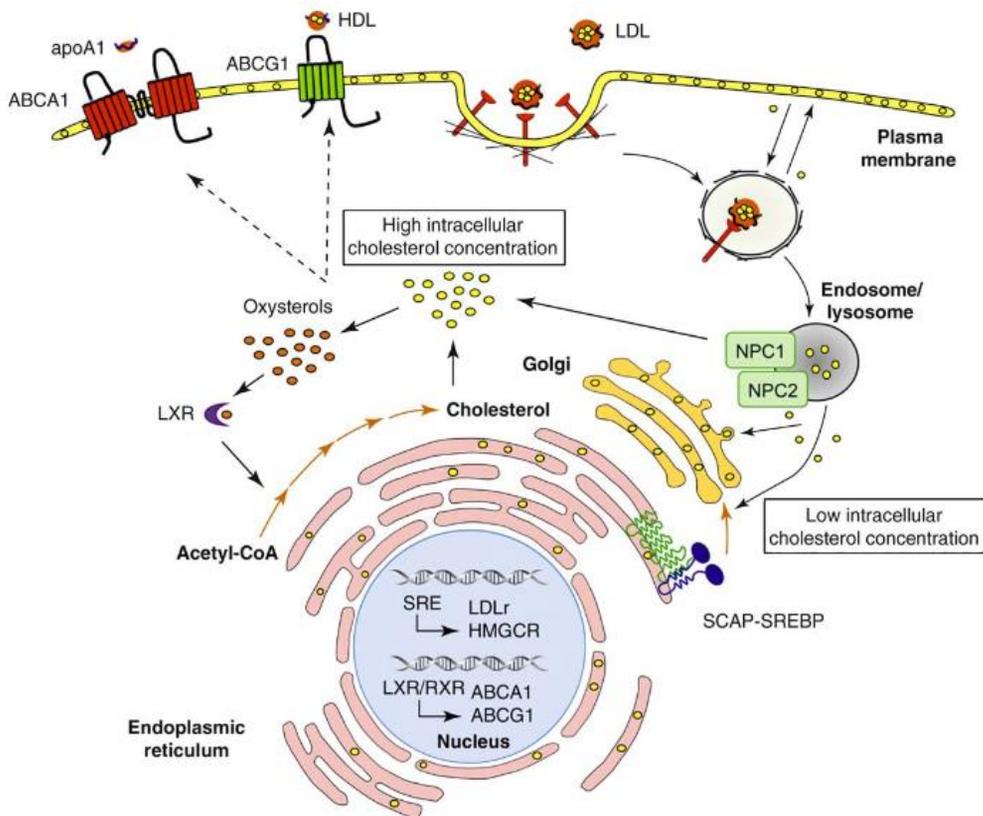


Figura 1.15. Regulación del metabolismo celular del colesterol (Moore et al., 2010).

En este complejo sistema de mantenimiento de la homeostasis de colesterol, el hígado es un órgano clave, puesto que sintetiza colesterol, secreta colesterol mediante bilis, recibe remanentes de quilomicrones, partículas VLDL, IDL y LDL a través del receptor rLDL y está involucrado en el transporte reverso de colesterol (Dietschy et al., 1993). Sin embargo, estudios recientes revelan un papel importante del intestino sobre la homeostasis de colesterol, donde el transportador intestinal NPC1L1 (ver apartado 1.1.2.2) no sólo se limita a la absorción de colesterol, sino que parece estar implicado en el mantenimiento de una concentración de colesterol estable en el organismo (Sane, 2006). La eliminación del transportador NPC1L1 incrementa la actividad de SREBP promoviendo la síntesis de colesterol vía endógena y aumentando el número de receptores rLDL (ver apartado 1.1.6), hecho que no sólo se observa en los enterocitos sino que también ocurre en el hígado. Además, el déficit en NPC1L1 ocasiona una menor actividad de la enzima ACAT-2 (acil CoA:colesterol aciltransferasa-2) en los enterocitos (Pramfalk et al., 2010). Asimismo, la inactivación de NPC1L1 induce una menor expresión de SR-BI (*Scavenger Receptor class B type 1*), pero sin afectar a ABCG5 y ABCG8 (proteínas transportadoras que se expresan en la superficie apical del intestino y promueven la secreción activa de esteroides desde el interior del enterocito al lumen intestinal) y CD36 (proteína implicada en el movimiento del colesterol dentro del enterocito).

La proteína SR-BI se encuentra predominantemente en el hígado y en la glándula adrenal y, en menor medida, también en el intestino delgado, localizándose tanto en la membrana apical como basolateral de los enterocitos. Su principal función es, como se ha comentado anteriormente, la de receptor de lipoproteínas HDL en el hígado. Sin embargo, no está definida aún su función en el intestino, por lo que la implicación de una menor expresión de SR-BI provocada por un déficit en NPC1L1 no está clara. Existen ciertas hipótesis que apuntan a que esta proteína podría estar implicada en la internalización de ésteres de colesterol en enterocitos (Uittenbogaard et al., 2002), aunque hay estudios que parecen descartar esta posibilidad (Valasek et al., 2005). Tampoco parece que SR-BI esté implicado en la excreción fecal de colesterol (Bura et al., 2013), pero puede que esté implicado en la preparación de la superficie del enterocito para la absorción lipídica en respuesta a un estímulo lipídico tras la ingesta de comida

(Béaslas et al., 2009) o estar involucrado como sensor de colesterol en la membrana y activación de una respuesta intracelular (Saddar et al., 2013).

La participación de los enterocitos en la homeostasis de colesterol también responde ante la regulación mediada por el receptor nuclear LXR, en respuesta a un exceso de oxisteroles, al igual que en otros órganos. En este caso, además de inducir un mayor transporte reverso vía ABCA1 y ABCG1, provoca la activación de los receptores LXR en los enterocitos e induce un aumento de las proteínas ABCG5/G8, promoviendo la salida de colesterol y fitosteroles desde el enterocito al lumen intestinal (Davidson, 2011). Este proceso podría ser la diana de terapias dirigidas a regular la acción de estos receptores a nivel únicamente intestinal, que permitirían reducir los niveles de colesterol LDL y modificar el metabolismo de las HDL sin afectar al resto del sistema.

1.1.8. Excreción de colesterol

El colesterol puede salir del organismo mediante dos formas: como esteroles neutro (colesterol y sus metabolitos tras la degradación por bacterias intestinales) o mediante la síntesis de ácidos biliares y subsecuente excreción mediante las heces, mecanismo más influyente en la eliminación del exceso de colesterol.

La acumulación de colesterol en el hígado, tanto el sintetizado *de novo* como el procedente de la circulación sanguínea, genera oxisteroles. Los derivados oxigenados del colesterol actúan como ligando del receptor nuclear LXR (receptor X del hígado). El LXR activado estimula la expresión de la enzima colesterol 7- α -hidroxilasa (CYP7A1; Tabla 1.4), enzima clave que sólo se encuentra en el hígado y que limita la velocidad de la conversión hepática del colesterol en ácidos biliares. El colesterol hepático, mediante la acción de dicha enzima, da lugar a ácidos biliares primarios (ácido quenodesoxicólico y ácido cólico), los cuales, tras la conjugación hepática con taurina o glicina, son secretados mediante transportadores tipo ABC (ABCB11 o BSEP) hacia el canalículo biliar para almacenarse en la vesícula biliar hasta su salida al duodeno. La expresión del transportador BSEP se encuentra altamente regulada por el receptor nuclear X

fernesoide (FXR), sobre el cual, las propias sales biliares actúan como ligando (Kubitz et al., 2012; Soroka y Boyer, 2014).

Una vez que los ácidos biliares primarios alcanzan el tracto intestinal se forman los ácidos biliares secundarios (deoxicólico, litocólico y ursodeoxicólico) como productos del metabolismo bacteriano (Monte et al., 2009), y ejercen sus funciones de solubilización de colesterol evitando su precipitación, emulsión de lípidos facilitando la digestión de los triglicéridos y absorción intestinal de vitaminas liposolubles. Los ácidos biliares que no son reabsorbidos y transferidos de nuevo al hígado, mediante circulación enterohepática, son excretados mediante las heces (Russell, 2009). Debido a ello, el organismo tiene que sintetizar más ácidos biliares empleando el colesterol como precursor.

LXR también facilita la salida de colesterol hacia la bilis mediante los transportadores ABCG5/G8 hepáticos (Dijkers y Tietge, 2010). Por otra parte, el receptor FXR activa la expresión del gen que codifica el inhibidor del receptor nuclear SHP (*Small Heterodimer Partner*). El receptor SHP reprime la activación de diversos factores de transcripción incluidos los LXR, por lo que en humanos, subsecuentemente, suprime la activación de la enzima CYP7A1 (Staels et al., 2010; Figura 1.16).

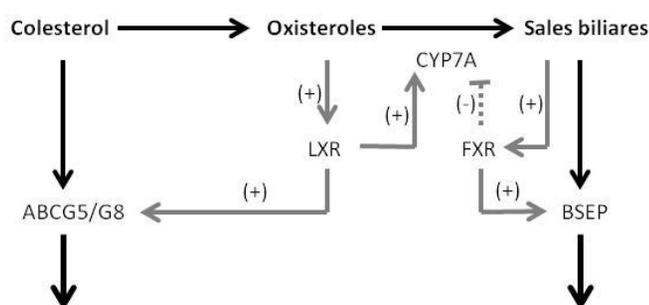


Figura 1.16. Catabolismo del colesterol a sales biliares

Además, en los últimos años se ha señalado la existencia de un mecanismo mediante el cual el colesterol se transfiere desde la sangre al intestino (TICE, *Trans-Intestinal Cholesterol Efflux*), de donde se excreta mediante las heces y que en humanos supone un tercio de la excreción fecal de esteroides neutros (Vrins, 2010). El

descubrimiento de esta nueva vía surgió en ratones deficientes en excreción de colesterol mediante bilis, en los cuales la excreción de colesterol neutro se mantenía similar entre los ratones *knockout* y el genotipo silvestre (Kruit et al., 2005). Sin embargo, aunque no está del todo claro qué transportadores participarían en esta vía, hay indicios que apuntan a un transportador ABCB1 y al transportador ABCG5/G8, ambos localizados en la región apical de los enterocitos, como excretores de colesterol desde el interior del enterocito al lumen intestinal (May et al., 2013). No obstante, hay muchas incógnitas en cuanto a cómo recibe el enterocito el colesterol desde el torrente sanguíneo.

Tabla 1.4. Principales enzimas implicadas en la homeostasis del colesterol y su regulación

Enzima	RE Lumen Citosol	Nivel de colesterol en la célula	
		↑ colesterol	↓ colesterol
HMG-CoA reductasa		-	+
SREBP		-	+
ACAT		+	-
Colesterol 7- α -hidroxilasa		+	-

Se muestra la topología de cada una de las enzimas, con sus extremos amino y carboxilo terminales y el punto de proteólisis de SREBP (flecha). El incremento o descenso de actividad en presencia o ausencia de colesterol se indica con los signos + y - respectivamente. NOTA: RE = membrana del retículo endoplasmático.

1.1.9. Modelos de estudio del metabolismo del colesterol

La absorción de colesterol se ha estudiado *in vitro* empleando líneas celulares que muestran las mismas características y funcionalidad que el epitelio intestinal *in vivo* y con moléculas testigo fácilmente detectables que son transportadas de la misma forma que el colesterol *in vivo*. Para ello, se emplean formulaciones de lipoproteínas o emulsiones artificiales de proteínas, para la elaboración de estructuras que aportan una configuración similar a la de las micelas, que permiten la incorporación de la molécula testigo (Kheiriloom y Ferrara, 2007).

En los ensayos que se presentan en esta memoria hemos empleado un análogo estructural del colesterol con propiedades fluorescentes, por lo que en este apartado nos centraremos en moléculas de este tipo, y que imitan la orientación nativa del colesterol en la membrana. Se pueden distinguir dos grupos de esteroides fluorescentes: (1) esteroides con fluorescencia intrínseca y (2) colesterol cuya cadena alquilo ha sido modificada para incorporar un fluoróforo químico (Figura 1.17). Los pertenecientes al primer grupo son posiblemente los que más se asemejan al colesterol, sin embargo poseen unas propiedades espectroscópicas más desfavorables en comparación con los del grupo 2, que en menor concentración son más fácilmente detectables (Gimpl y Gehrig-Burger, 2011). De entre los compuestos de este último grupo, cabe destacar el 22-NBD-colesterol, ya que incorporado en micelas, muestra un comportamiento tanto en ensayos *in vitro*, en células intestinales Caco-2, como *in vivo* en hámsteres, muy similar al colesterol en cuanto a cinética de absorción y metabolismo (Sparrow et al., 1999). Por esta razón, fue el análogo de colesterol seleccionado como molécula testigo en nuestros ensayos de absorción de colesterol.

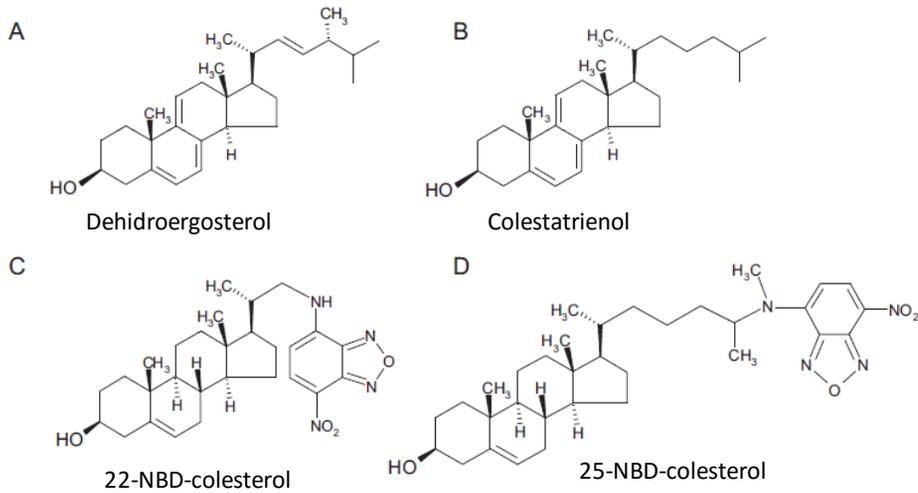


Figura 1.17. Ejemplos de análogos fluorescentes de colesterol.

1.2. Hipercolesterolemia

El colesterol es una molécula muy insoluble y se acumula en los leucocitos que se depositan en las zonas de lesión sobre las paredes internas de las arterias. Si las concentraciones de colesterol son demasiado elevadas, para su posterior eliminación hacia el torrente sanguíneo, estas células quedan repletas de depósitos grasos que luego se endurecen, formando una placa, proceso denominado aterosclerosis. Dicho proceso puede obstruir vasos sanguíneos y producir infartos de miocardio.

La organización mundial de la salud (OMS; WHO, *World Health Organization*) ha predicho que, en 2030, las enfermedades cardiovasculares serán de las principales causas de muerte, afectando aproximadamente a 23,6 millones de personas en el mundo (WHO, 2009). La hipercolesterolemia contribuye al 45 % de los ataques al corazón en la Europa occidental y al 35 % en el centro y este de Europa (Kumar et al., 2012; Yusuf et al., 2004). El riesgo de un ataque al corazón es tres veces superior en casos de hipercolesterolemia si se compara con un perfil lipídico normal.

Además de la genética, diversos factores fisiológicos (edad, obesidad, velocidad de tránsito intestinal y capacidad detergente de los ácidos biliares en la circulación

hepática) y dietéticos (tipo y cantidad de grasa, carga de colesterol o fitoesteroles y cantidad de fibra) ejercen una influencia variable sobre la eficiencia en la absorción de colesterol en el intestino. Por ello, la OMS señala que dietas no saludables, como las ricas en grasas, sal y azúcar y bajas en carbohidratos, frutas y vegetales aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Los tratamientos para reducir los niveles de colesterol implican reducir el consumo de grasas mediante la dieta, ejercicio regular y terapia con fármacos. Hay varios agentes farmacológicos que reducen de manera eficiente los niveles de colesterol. Sin embargo, en general, son caros y no se conocen completamente los efectos secundarios que pueden producir (WHO, 2003).

Como ya se ha comentado anteriormente (ver apartado 1.1.2.2), la absorción de colesterol exógeno es un proceso complejo, pero se considera que su inhibición es la mejor estrategia terapéutica para reducir los niveles de colesterol en suero y, por consiguiente, para reducir el riesgo cardiovascular. El paso más crítico de todo el proceso se centra en el transportador NPC1L1, puesto que se ha visto que ratones que carecen de dicho transportador muestran un 70 % menos de absorción de colesterol (Altmann et al., 2004; Davis et al., 2004). Proteínas como SR-BI (Altmann et al., 2002), ABCA1 (Groen et al., 2001) y CD36 (Nauli et al., 2006), aunque son importantes en el proceso de absorción de colesterol, no han demostrado ser una diana tan eficiente como NPC1L1 en ensayos destinados a inducir un descenso de la absorción de colesterol intestinal.

1.2.1. Tratamientos de la hipercolesterolemia

Los fármacos más utilizados para reducir los niveles de colesterol son las estatinas, que actúan sobre la síntesis endógena de colesterol (ver apartado 1.1.2.1). No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, el intestino delgado contiene numerosos transportadores y receptores nucleares que modulan la homeostasis del colesterol (ver apartado 1.1.7), jugando un papel determinante en la regulación de la concentración sanguínea de esta molécula, lo que convierte al intestino en un blanco

claro para modificar el riesgo cardiovascular asociado a una alta concentración de colesterol plasmático.

Por una parte, cada vez se realizan más estudios con compuestos que interfieren en la fase mucosa de absorción de colesterol, como son el medicamento ezetimiba o compuestos naturales como los fitoesteroles. Por otro lado, un tercio de todo el transporte reverso de colesterol involucra al intestino delgado. En este sentido, terapias que regulen los receptores LXR en el intestino podrían reducir la absorción de este compuesto, y además aumentar el transporte reverso de colesterol a través de un incremento en la expresión de ABCA1 (transportador encargado de liberar partículas HDL nacientes desde el enterocito al plasma sanguíneo). Además, se están estudiando otros puntos clave en el proceso de absorción del colesterol, como por ejemplo la colesterol esterasa, diana para el desarrollo de agentes hipocolesterolémicos, donde se están buscando moléculas que ocupen el sitio de unión de esteroides de esta enzima, como estructuras aromáticas o cadenas carbamilo de entre 6 y 7 carbonos, entre otras (John et al., 2013). Inhibir enzimas como la ACAT-2, puede suponer un marcado descenso de colesterol, en forma de quilomicrones, que pasa a la linfa, además de promover el transporte reverso del colesterol (Repa et al., 2004). La inhibición de esta enzima es el objetivo de distintos estudios llevados a cabo con diversos extractos naturales (Lee et al., 2006; Lee et al., 2008). Otra enzima clave en la absorción intestinal de colesterol procedente de la dieta es la MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer protein*), enzima que participa en la formación de quilomicrones y sobre la que se están probando nuevos fármacos para conseguir reducir su actividad (Raper et al., 2015).

1.2.1.1. Tratamientos farmacológicos

Tratamientos con estatinas

Las estatinas, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, se han utilizado con éxito desde finales de 1980 para inhibir la síntesis de colesterol y reducir la mortalidad cardiovascular (Armitage, 2007). La reducción del colesterol sintetizado en el hígado, provocada por las estatinas, se compensa en el organismo mediante la síntesis de

receptores LDL, que se encargan de captar más colesterol plasmático, reduciendo de esta forma la concentración en sangre de estas lipoproteínas (Figura 1.10).

Algunas estatinas (pravastina) parecen inhibir preferentemente la síntesis en el hígado y el intestino (90%). Otras estatinas (lovastina) muestran una inhibición generalizada de la síntesis de colesterol. Estatinas más recientes como la pitavastatina, con un perfil metabólico distinto, muestran una reducción en la incidencia de efectos adversos como mialgias y miopatías (Maron et al., 2000). Además, se están diseñando nuevos fármacos que inhiben la síntesis de colesterol en diferentes niveles de la vía, como por ejemplo los inhibidores de la escualeno sintasa (Figura 1.2). No obstante, estos inhibidores no tienen como diana pasos limitantes de la síntesis de colesterol, y por esta razón, no parecen reducir de forma efectiva la síntesis de colesterol. Por ello no son considerados eficaces como monoterapia a dosis tolerables.

Por otro lado, la eficacia de las estatinas en el tratamiento de la hipercolesterolemia ha mostrado cierta variabilidad, que puede deberse a muchos factores, tanto genéticos como ambientales y fisiológicos, sin olvidar que la complejidad de los procesos implicados en la homeostasis de colesterol y su regulación, hace que sea difícil prever la respuesta fisiológica ante un descenso en la síntesis *de novo* de colesterol (Betters y Yu, 2010).

Secuestradores de ácidos biliares

Algunas resinas de intercambio iónico como la colestiramina, colestipol, colestimida o colesevelam, pueden emplearse como agentes hipocolesterolémicos gracias a su capacidad de unirse a ácidos biliares en el intestino, formando un complejo insoluble que es excretado mediante las heces. De modo que inhiben la absorción de colesterol mediante dos formas, por un lado impiden la formación de micelas y, por otro, impiden la reabsorción de sales biliares obligando al organismo a restablecer los ácidos biliares empleando el colesterol como precursor (Herrema et al., 2010; Suckling et al., 1991). Estos compuestos actúan como antagonistas del receptor X farnesoide (FXR), induciendo un incremento en la actividad de la enzima colesterol 7- α -hidroxilasa,

promoviendo la síntesis de ácidos biliares y aumentando la producción de receptores LDL (Tu et al., 2000).

Ezetimiba

La ezetimiba, marca registrada como Zetia, es un inhibidor selectivo del transporte del colesterol (tanto del procedente de los alimentos como de origen biliar) y fitosteroles, a través de la membrana de los enterocitos debido a su elevada afinidad por el transportador de membrana NPC1L1 (Figura 1.18; Altmann et al., 2004; Garcia-Calvo et al., 2005; Ge et al., 2008; Temel et al., 2007).

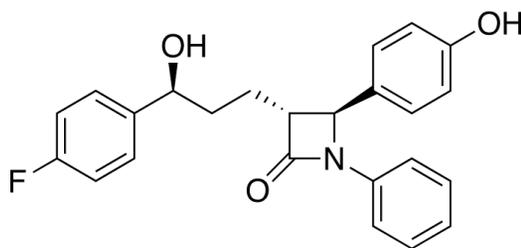


Figura 1.18. Estructura química de ezetimiba

El mecanismo de inhibición exacto no se conoce del todo, aunque algunas investigaciones parecen indicar que la ezetimiba produce un cambio conformacional en la proteína NPC1L1 que hace que el colesterol no pueda unirse a dicha proteína, o previene la interacción entre la clatrina y el complejo AP-2 impidiendo la internalización del complejo NPC1L1-colesterol (Figura 1.6; Ge et al., 2008). El efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de colesterol se ha demostrado tanto en ratones (Altmann et al., 2004) como en humanos (Sudhop et al., 2002). Aunque algunos trabajos indican que un tratamiento combinado de ezetimiba con estatinas puede ser efectivo en el tratamiento de la hipercolesterolemia (Sudhop et al., 2009), otros indican que dicha combinación no afecta a la progresión de la placa aterogénica en casos de aterosclerosis asociada a hipercolesterolemia (West et al., 2011).

La inhibición de absorción mediada por ezetimiba es selectiva para el colesterol y fitoesteroles, de modo que no afecta a la absorción de ácidos grasos, ácidos biliares,

vitaminas liposolubles u otras moléculas esteroides, como estrógenos y progesterona (van Heek et al., 2001), aunque sí podría verse afectada la absorción de vitamina E (α -tocoferol; Narushima et al., 2008). No tiene efecto sobre la actividad de enzimas pancreáticas, a diferencia del orlistat (inhibidor de lipasa pancreática, que reduce la absorción de colesterol, presumiblemente porque lo atrapa en una fase oleosa intraluminal impidiendo su acceso a las micelas) ni sobre la solubilización micelar del colesterol como las resinas de intercambio iónico (van Heek et al., 2001).

Algunos estudios llevados a cabo con ezetimiba indican que este compuesto también podría alterar la secreción de colesterol a través de las proteínas ABCG5/G8 (Jakulj et al., 2010), pero que tendría un mayor impacto sobre todo en los transportadores ABCG5/G8 del hígado, lo que afectaría a la vía de transporte reverso del colesterol promoviendo su secreción biliar. Este efecto, junto con la inhibición de absorción a través del transportador NPC1L1 en el intestino, podría explicar la reducción en los niveles de colesterol plasmático asociada al consumo de este medicamento (Altemus et al., 2014).

1.2.1.2. Tratamientos naturales

Esteroles y estanoles vegetales

Los esteroles y estanoles vegetales (fitoesteroles/fitoestanoles) son compuestos estructuralmente similares al colesterol. Los fitoesteroles tienen un doble enlace en posición 5, mientras que los fitoestanoles no tienen este doble enlace (Figura 1.19). Al no poder ser sintetizados por los humanos siempre provienen de la dieta mediante productos alimenticios como cereales integrales, frutos secos, semillas, aceites o suplementos dietéticos (Gylling et al., 2014). Los ejemplos más utilizados son el sitosterol y el campesterol.

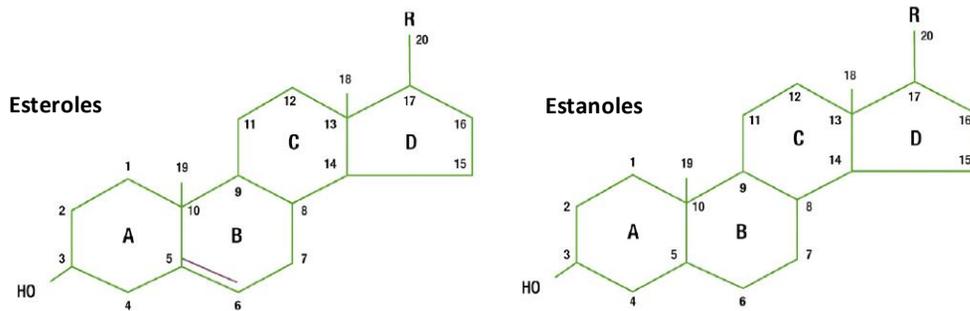


Figura 1.19. Fórmula estructural de los esteroles y estanoles vegetales.

Estos compuestos son absorbidos en el intestino de una forma notablemente menos eficiente que el colesterol. Además, una vez absorbidos por el enterocito, no son esterificados por la enzima ACAT-2, o lo son muy pobremente (Temel et al., 2003), por lo que su principal destino es ser transportados de nuevo al lumen intestinal a través del transportador ABCG5/G8 (Yu et al., 2002b).

El mecanismo de acción a través del cual los fitoesteroles y fitoestanoles reducen los niveles de LDL no está del todo establecido. Existen varias hipótesis como la formación de cristales insolubles con el colesterol, interacción con enzimas digestivas, regulación de la expresión de LXR produciendo un aumento de los transportadores ABCG5/G8 o competición con el colesterol por ser sustrato de la enzima ACAT-2 (Field y Mathur, 1983; Kaneko et al., 2003). Sin embargo, la hipótesis que parece tener más fuerza es la competición con el colesterol, para solubilizarse en las micelas en el lumen intestinal, bloqueando el acceso del colesterol a la superficie de las micelas y reduciendo su solubilización (Jesch y Carr, 2006). Como ya se ha comentado, su fórmula química es similar a la del colesterol, compartiendo el mismo núcleo, pero siendo los fitoesteroles mucho más lipofílicos debido a la complejidad de su cadena lateral, lo que les da mayor afinidad por el taurocolato que compone las micelas.

Galato de epigallocatequinas

Uno de los potenciales beneficiosos sobre la salud del té verde es su capacidad de modificar los parámetros lipídicos en sangre. Esta capacidad se atribuye a los

polifenoles que posee, como las catequinas, que comprenden el 80 – 90 % de los polifenoles encontrados en el té verde (Kim et al., 2011). Uno de los compuestos que tiene efecto hipocolesterolémico es el galato de epigalocatequina, EGCG (Kirana et al., 2005), gracias a la capacidad que tiene de reducir la solubilidad del colesterol en las micelas artificiales debido a su dominio hidrofóbico (Figura 1.20). Su efecto se ha comprobado en animales de experimentación, demostrando una disminución de la hipercolesterolemia en ratas (Ikeda et al., 2003).

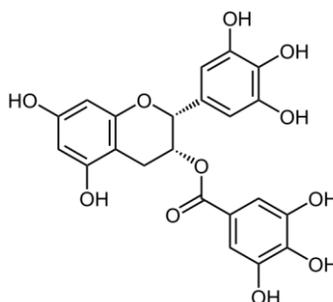


Figura 1.20. Estructura química del galato de epigalocatequina, EGCG.

1.3. Probióticos

Como ya se ha comentado anteriormente, la hipercolesterolemia está marcada por altos niveles de LDL en suero y representa uno de los mayores factores de riesgo de sufrir enfermedades coronarias. Aunque existen fármacos efectivos para reducir los niveles de colesterol, generalmente son caros y pueden tener efectos secundarios adversos. Por este motivo, existe la necesidad de buscar productos alimenticios naturales, libres de las características negativas mencionadas, capaces de reducir los niveles de colesterol en plasma; y los microorganismos probióticos pueden ser una opción para cubrir esta necesidad.

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que ingeridos en una determinada concentración poseen un efecto beneficioso sobre el hospedador (FAO/OMS, 2002). Estos organismos ya se emplean en inmunomodulación, modificación

de la microbiota intestinal y otros efectos metabólicos y terapéuticos (Figura 1.21; Anandharaj et al., 2014; Lye et al., 2009; Parvez et al., 2006; Scholz-Ahrens et al., 2007; Songisepp et al., 2004). Como se muestra en la figura 1.21, también se han realizado estudios con probióticos que muestran la capacidad de reducir los niveles de colesterol en suero, principalmente a través de la acción de sus enzimas hidrolasas de sales biliares, que ejercen un efecto similar al obtenido con los secuestradores de ácidos biliares.

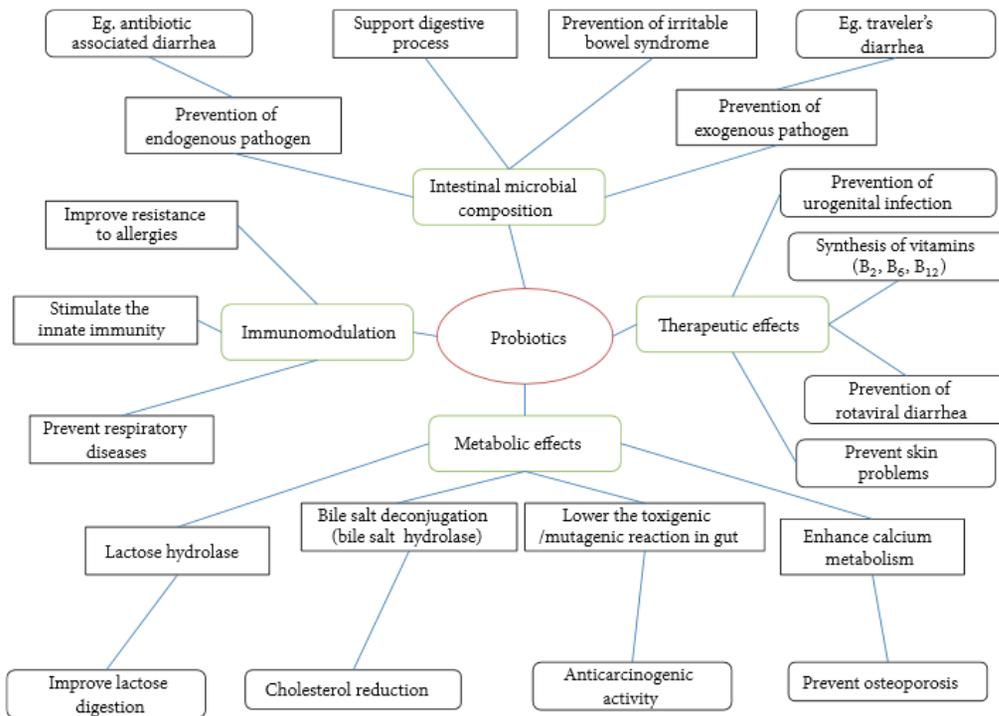


Figura 1.21. Efectos beneficiosos postulados de los probióticos sobre la salud (Anandharaj et al., 2014).

1.3.1. Generalidades de los probióticos

La mayoría de bacterias probióticas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Figura 1.22), siendo muchas de ellas consideradas seguras y calificadas como QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por el comité científico de la EFSA (EFSA,

2012). Las características básicas de estos dos géneros bacterianos se resumen en la tabla 1.5 (Gomes y Malcata, 1999; Sánchez et al., 2012).

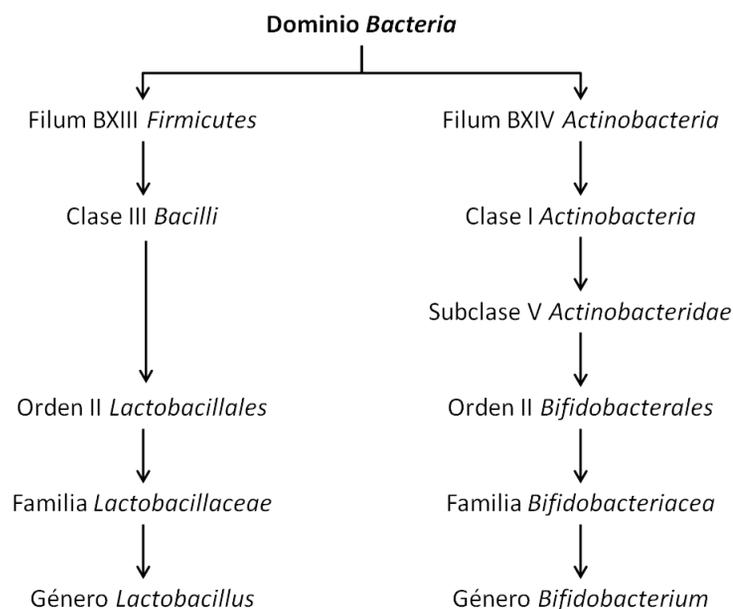


Figura 1.22. Clasificación de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en los taxones superiores del dominio *Bacteria*.

Tabla 1.5. Características fisiológicas y bioquímicas de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. (Madigan et al., 2004; Prasanna et al., 2014).

	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Tinción de Gram	Positiva	Positiva
Morfología	Bacilos	Bacilos pequeños, frecuentemente corineformes en Y, V o X.
Pared celular	Peptidoglicano tipo Lisina-D-Asparagina	Peptidoglicano unido a ornitina o lisina
Temperatura	30-40 °C	37-41 °C
pH	pH 5,5-6,2	pH 6-7
Tolerancia al oxígeno	Anaerobios aerotolerantes	Anaerobios*
Productor ácido láctico	D y L	L
Contenido GC	32-53 %	55-67 %
Metabolismo de azúcares	Homofermentativo (la gran mayoría)	Heterofermentativo

*con diferentes grados de tolerancia al oxígeno dependiendo de la especie

1.3.2. Selección de bacterias con capacidad probiótica

Aunque tradicionalmente se ha recomendado que las cepas probióticas sean aisladas de la misma especie donde se vayan a aplicar, por el hecho de que son cepas que se encuentran en el organismo de forma natural, la selección de bacterias probióticas se realiza en base a criterios microbiológicos generales como seguridad, aspectos funcionales y tecnológicos.

1.3.2.1. Resistencia a antibióticos

Se deben descartar bacterias con resistencia a antibióticos y ciertas actividades metabólicas que conlleven efectos adversos en el consumidor, como la producción de toxinas o actividad hemolítica. La resistencia a antibióticos es de los campos más estudiados en cuanto a seguridad de los probióticos. Las bacterias pueden poseer una resistencia intrínseca o debida a una mutación no transmisible, ambos casos no suponen un riesgo para el consumidor. Sin embargo, son las resistencias adquiridas mediante adición de genes las que pueden suponer un riesgo para la salud global, debido a la posibilidad de que la dotación genética responsable de dichas resistencias pueda ser transferida a microorganismos patógenos (Bernardeau et al., 2008).

1.3.2.2. Aspectos funcionales

Existen diversos aspectos funcionales a tener en cuenta a la hora de seleccionar bacterias probióticas: la capacidad de sobrevivir al proceso de digestión gastrointestinal, marcada por la acidez del jugo gástrico y la concentración de sales biliares; la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, que depende de la cepa y del sustrato disponible (como por ejemplo las mucinas); la interacción con patógenos y otras bacterias comensales, debido a la competición por los nutrientes; y la habilidad de estimular el sistema inmune del hospedador.

Algunas de estas características son intrínsecas a las distintas cepas bacterianas. Sin embargo, la capacidad de resistir el efecto tóxico que exhibe la bilis secretada en el duodeno, puede ser modulada en algunas especies bacterianas. Los lactobacilos y

bifidobacterias poseen mecanismos de defensa para resistir la acción deletérea causada por este compuesto (Kurdi et al., 2006). Aunque la tolerancia a la bilis es específica de cepa, algunas cepas pueden desarrollar una adaptación a estos compuestos (Burns et al., 2010), lo que permite seleccionar microorganismos con características específicas (Chou y Weimer, 1999): expresión de transportadores que compensan el flujo de sales (Ruiz et al., 2012), expresión de hidrolasas de sales biliares (Lambert et al., 2008) o cambios en la arquitectura y composición de la membrana y pared celular (Taranto et al., 2003).

1.3.2.3. Aspectos tecnológicos

Entre los aspectos tecnológicos que hay que tener en cuenta para seleccionar cepas probióticas destacan la capacidad de ser cultivadas fácilmente, resistir procesos industriales agresivos, mantener viabilidad celular en distintas matrices y durante periodos largos de tiempo, exhibir buenas propiedades organolépticas y no poseer bacteriófagos activos o ser resistentes a infección por los mismos.

Un aspecto del empleo de bacterias probióticas que está adquiriendo importancia en los últimos años es el estudio de los efectos sobre la salud del consumidor de las bacterias inactivadas mediante diversos tratamientos o el uso de los metabolitos producidos por éstas. Existen evidencias de que bacterias no viables tienen gran potencial para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alergias, colitis e hipercolesterolemia (Adams, 2010; Ouwehand y Salminen, 1998; Taverniti y Guglielmetti, 2011). En este sentido, algunos estudios *in vitro* y en animales de experimentación han demostrado efectos comparables sobre la respuesta inmune de cepas probióticas vivas y tras ser inactivadas (Ouwehand y Salminen, 1998; Rodríguez-Nogales et al., 2015). Se ha observado también que bacterias muertas pueden adherirse a receptores específicos del endotelio y estimular el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, *Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*; Adams, 2010). La capacidad de estos microorganismos de mantener algunas propiedades incluso en forma de células no viables se relaciona con características específicas de la pared celular (Jensen et al., 2010), componentes de los ácidos teicoicos (Matsuguchi et al., 2003) y proteínas de la capa S (Konstantinov et al., 2008).

Hay que destacar, sin embargo, que distintos tratamientos no afectan por igual a distintas estirpes bacterianas, dando lugar a diferentes respuestas (Ouweland et al., 2000; Sañudo et al., 2016). Aún así, las ventajas tecnológicas que presentan los probióticos inactivados, como una mayor vida útil, sencillez en el transporte y almacenamiento, e incluso mejoras en cuanto a su seguridad, hacen muy atractivo explorar el empleo de nuevas cepas o nuevas aplicaciones en este campo de estudio.

1.3.2.4. Búsqueda de actividades biológicas en cepas probióticas

Las ventajas que generalmente se asocian al empleo de probióticos como ingrediente activo terapéutico han hecho que, durante los últimos años, la investigación en este campo haya generado información sobre un gran número de cepas probióticas distintas y sobre multitud de posibles aplicaciones. Aun así, la investigación en el campo de los probióticos, encaminada a la búsqueda de nuevas cepas y/o actividades biológicas de interés, presenta el inconveniente de un número limitado de microorganismos disponibles, frente a los miles de muestras que normalmente componen las colecciones de compuestos químicos empleados en programas farmacéuticos de *screening* (Huggins et al., 2011).

En nuestro caso, los ensayos que se presentan en esta memoria se han llevado a cabo empleando una colección de muestras seleccionadas a partir de cepas bacterianas procedentes de 3 orígenes diferentes: leche de vaca, leche humana y sub-productos de la industria alcoholera. Partiendo de aproximadamente 200 perfiles diferentes de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) se seleccionaron 21 cepas teniendo en cuenta su supervivencia a pH ácido (hasta pH 3) y presencia de sales biliares (0,15 % en el medio de cultivo), su adhesión a mucinas, su capacidad antimicrobiana (frente a *Staphylococcus aureus*) y sus capacidades inmunoestimulante e inmunomoduladora (Díaz-Ropero et al., 2007). Además, se añadieron a la colección, cepas bacterianas con capacidades probióticas ya reconocidas en diversos estudios, como *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 y *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 (Lara-Villoslada et al., 2007; Olivares et al., 2006), *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 (Martín et al., 2005) y *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 (Martín et al., 2006). Por último, completamos la colección con otras cepas estudiadas en Biosearch, S.A. en el marco de otros proyectos.

Es el caso de *Lactobacillus salivarius* CECT 7261, *Lactobacillus reuteri* CECT 7260 y *Bifidobacterium breve* CECT 7263.

En conjunto, dispusimos de 28 cepas bacterianas, caracterizadas en cuanto a algunas propiedades consideradas positivas en microorganismos probióticos, parcialmente en algunos casos. Ensayos previos realizados con la misma colección bacteriana han demostrado que la diversidad funcional de dichos microorganismos podía ser incrementada mediante el procesamiento de cada microorganismo mediante tratamientos físico-químicos (Sañudo et al., 2016). Por este motivo, finalmente, empleamos una colección de 336 muestras formadas por microorganismos viables, inactivados mediante distintos medios y por metabolitos derivados. Las características de esta colección se detallarán más adelante (ver apartado 3.5 de “Materiales y Métodos”).

1.3.3. Probióticos para el tratamiento de la hipercolesterolemia

Los primeros datos sobre la influencia del consumo de probióticos sobre el perfil lipídico plasmático en humanos pertenecen a los trabajos de Shaper y Mann, que observaron que una gran cantidad de ingesta de leche fermentada por los hombres de las tribus Samburu y Masai en África les permitía tener unos niveles bajos de colesterol en sangre (Mann y Spoerry, 1974; Shaper et al., 1963). Desde entonces, se han realizado multitud de ensayos *in vivo* en los que se ha visto que ciertos probióticos tienen la capacidad de reducir las concentraciones de colesterol en suero (Tabla 1.6).

Muchos estudios han empleado ratas, ratones, hámster, cobayas y cerdos como modelos similares a los humanos en términos del metabolismo del colesterol y ácidos biliares, distribución lipoproteica del plasma y regulación de enzimas hepáticas. Estos animales también muestran una anatomía digestiva y fisiológica, unos requerimientos nutricionales, disponibilidad y absorción y procesos metabólicos similares a los humanos. El efecto beneficioso del consumo de algunas cepas probióticas, observado en modelos animales, ha sido corroborado también en estudios clínicos llevados a cabo en

seres humanos (Tabla 1.7). Es por ello que varias compañías han desarrollado y comercializan productos probióticos recomendados para reducir los niveles de colesterol en sangre (Tabla 1.8), a pesar de que su eficacia no haya sido reconocida por la EFSA (Binnendijk y Rijkers, 2013). En este trabajo, hemos confirmado la capacidad de al menos una cepa de las contenidas en el producto Primacol® de hidrolizar sales biliares, tal y como informa su fabricante, siendo empleada como control positivo en algunos de los ensayos que se presentan en la memoria.

Tabla 1.6. Efecto de probióticos sobre el perfil lipídico en diversos modelos animales.

Cepa	Dosis	Días	Resultado	Acción	Ref
Rata Sprague-Dawley					
<i>B. longum</i> BL1	2·10 ⁹ ufc/d*	21	↓CT (20 %) ↓LDL (40 %) ↓TG (10%)		1
<i>L. plantarum</i> NS5	2·10 ⁹ ufc/d*	42	↓TG (18,11 %) ↓LDL (33,33 %)	HMG	2
Cerdo Yorkshire					
<i>L. acidophilus</i> ATCC43121	2,5·10 ¹¹ ufc/d	15	↓CT (10 %) ↓LDL (15 %)	HSB	3
<i>L. acidophilus</i> RP32	5·10 ¹⁰ ufc/d	10	↓CT (15 %)	Asim	4
Cobaya <i>Cavia porcellus</i>					
<i>L. bulgaricus</i>	1,7·10 ¹¹ ufc/d*	14	↑HDL (70 %)	-	5
<i>S. thermophilus</i>	1,4·10 ¹⁰ ufc/d*				
Ratón C57BL/6					
<i>L. plantarum</i> KCTC3928	10 ⁹ ufc/d	28	↓CT (33 %) ↓LDL (42 %) ↓TG (32 %) ↑HDL (35 %)	HSB	6
Ratón ICR					
<i>L. plantarum</i> PH04	10 ⁷ ufc/d	14	↓CT (7 %) ↓TG (10 %)	HSB	7
Ratón Swiss Albino					
<i>L. reuteri</i> CRL 1098	10 ⁴ ufc/d	7	↓CT (38 %) ↑HDL/LDL (20 %)	HSB	8
Hámster Golden Syrian					
<i>L. reuteri</i> 263	2,1·10 ⁹ ufc/d	42	↓CT (20 %) ↓TG (40 %) ↑HDL/LDL (50 %)	HSB	9

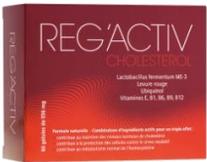
*Asumiendo un consumo de pienso y agua, en ratas, de 20 g/d y 20 mL/d, respectivamente; y un consumo de 90 mL de agua en cobayas. NOTA: CT = colesterol total; TG = triglicéridos; HSB = actividad hidrolasa de sales biliares. Asim = asimilación de colesterol. HMG = inhibición HMG-CoA reductasa.(1) Xiao et al., 2003; (2) Hu et al., 2013; (3) De Rodas et al., 1996; (4) Gilliland et al., 1985; (5) Ranasinghe et al., 2013; (6) Jeun et al., 2010; (7) Nguyen et al., 2007; (8) Taranto et al., 1998; (9) Huang et al., 2015.

Tabla 1.7. Estudios con probióticos en humanos y su efecto sobre los niveles séricos de colesterol.

Cepa	Dosis (ufc/d)	Efecto	Mecanismo de acción
<i>L. plantarum</i> 299v ^A	2·10 ¹⁰	↓ LDL (12 %)	Producción de AGCC
<i>B. longum</i> BL1 ^B	10 ⁸	↓ CT (> 5 %)	Excreción de colesterol y ácidos biliares
VSL#3 ^{C,1}	1,1·10 ¹¹	↑ HDL (18,5 %) ↓ LDL (7,04 %) ↓ TG (5,8 %) ↓ VLDL (12,98 %)	Actividad HSB y producción de AGCC
<i>L. casei</i> W8 ^D	10 ¹⁰	↓ TG	-

¹Producto mezcla de *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Bacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. TG = triglicéridos; CT = colesterol total; AGCC = ácidos grasos de cadena corta. ^ANaruszewicz et al., 2002; ^BXiao et al., 2003; ^CRajkumar et al., 2014; ^DBjerg et al., 2014.

Tabla 1.8. Ejemplos de fórmulas probióticas para reducir los niveles de colesterol.

Nombre	Casa comercial	Cepa	Mecanismo de acción
	Micropharma	<i>L. reuteri</i> NCIMB 30242	Actividad hidrolasa de sales biliares
	Probio Medicare	<i>L. fermentum</i> ME-3	Efecto de levadura roja del arroz sobre la HMG-CoA reductasa.
	AB-BIOTICS	Tres cepas de <i>L. plantarum</i> CECT 7527, CECT 7528 y CECT 7529	Actividad hidrolasa de sales biliares
	Quest	Dos cepas: <i>L. rhamnosus</i> y <i>L. bulgaricus</i>	Esteroles de origen vegetal, levadura roja de arroz y asimilación por parte de las cepas probióticas

La capacidad de reducir o alterar los niveles de colesterol plasmático, que exhiben algunos microorganismos probióticos, ha sido estudiada en distintos tipos de ensayos *in vitro*. Varias actividades biológicas podrían explicar su efecto sobre el metabolismo de colesterol y los perfiles lípidos plasmáticos: desconjugación de ácidos biliares mediante hidrolasas de sales biliares, asimilación de colesterol por los probióticos (mediante unión a la pared celular o la incorporación del colesterol al interior de las membranas durante la fase de crecimiento), formación de ácidos grasos de cadena corta que afectan a la síntesis endógena de colesterol o la conversión de colesterol a coprostanol en el intestino (Cheng y Lai, 2000; Chiang et al., 2008; Lye et al., 2010a).

1.3.3.1. Desconjugación enzimática de ácidos biliares mediante hidrolasas de sales biliares de los probióticos

Las bacterias ácido-lácticas con actividad hidrolasa de sales biliares (HSB) podrían ser capaces de reducir los niveles de colesterol en suero interaccionando con el metabolismo de las sales biliares del hospedador, de forma comparable al mecanismo de actuación de los secuestradores de ácidos biliares. Estas bacterias poseen enzimas responsables de hidrolizar conjugados de ácido glicodesoxicólico y ácido taurodesoxicólico. Una vez desconjugados, los ácidos biliares son menos solubles y no absorbibles por el intestino, por lo que su destino es ser eliminados por medio de las heces. El colesterol se usa para sintetizar nuevos ácidos biliares como respuesta homeostática, dando como resultado un descenso de colesterol en suero. Además, el descenso de colesterol hace que se incremente la actividad de los receptores LDL de los hepatocitos, incrementándose de esta forma la eliminación de colesterol LDL plasmático (Figura 1.23; Smet et al., 1994).

Existen diferentes hipótesis, resumidas en la tabla 1.9, acerca de la función microbiológica que esta actividad aporta a las bacterias (Begley et al., 2006), aunque la clave está en que esta actividad enzimática les confiere una ventaja adaptativa para sobrevivir y colonizar el intestino.

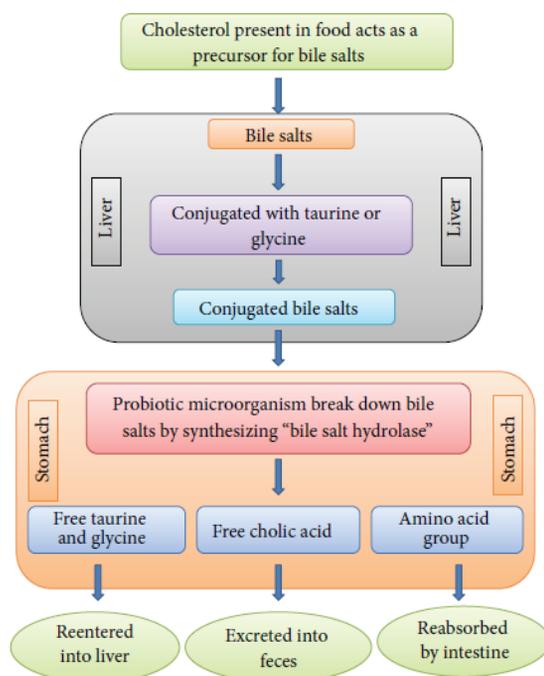


Figura 1.23. Reducción de los niveles de colesterol mediante la actividad hidrolasa de sales biliares por parte de microorganismos probióticos (Anandharaj et al., 2014).

Tabla 1.9. Capacidad que las hidrolasas de sales biliares confieren a las bacterias.

Función	Efecto
Detoxificación biliar	Las sales biliares ejercen un efecto tóxico acidificando el medio intracelular, por tanto las bacterias con actividad HSB son capaces de autoprotgerse mediante la desconjugación de sales biliares.
Persistencia gastrointestinal	La actividad HSB no es esencial para la colonización pero si ayuda a mantenerse en un ecosistema competitivo.
Papel nutricional	Los aminoácidos liberados de la hidrólisis sirven como fuente de carbono, nitrógeno y energía confiriendo una ventaja nutricional.
Alteraciones en la membrana	La actividad HSB facilita la incorporación de colesterol o bilis en las membranas bacterianas, lo que hace que aumente la resistencia a la tensión en las membranas o cambia su fluidez o carga.

1.3.3.2. Asimilación de colesterol por los probióticos

El efecto hipocolesterolémico de los probióticos también ha sido atribuido a su habilidad de unir colesterol en el intestino delgado. Aunque existe poca información acerca de la capacidad de asimilar colesterol por parte de lactobacilos, hay especies que requieren de colesterol exógeno para su crecimiento, como bacterias del género *Mycoplasma*, y que son capaces de incorporarlo en su membrana citoplasmática (Melchior y Rottem, 1981; Razin, 1975). Existen estudios en los que determinadas cepas probióticas son capaces de asimilar colesterol en determinadas condiciones para incorporarlo a su membrana en lugar de metabolizarlo (Noh et al., 1997), aunque esta capacidad parece no ser universal en especies de lactobacilos y bifidobacterias y depender de la cepa y de las condiciones de crecimiento específicas (Usman y Hosono, 1999). En este sentido, cepas concretas de *Lactobacillus acidophilus* son capaces de asimilar colesterol del medio de cultivo sólo en presencia de sales biliares y condiciones de anaerobiosis (Gilliland et al., 1985). En el caso de ciertas cepas del género *Bifidobacterium*, la capacidad de asimilar colesterol del medio extracelular está determinada por la fase de crecimiento (Tahri et al., 1995).

La asimilación de colesterol por bacterias probióticas parece estar relacionada con su capacidad de hidrolizar sales biliares, aunque la presencia de esta actividad enzimática en un microorganismo no implica necesariamente que pueda asimilar colesterol. La hidrólisis de sales biliares parece facilitar la asimilación de colesterol debido a que, por una parte, favorece la precipitación de este compuesto (Klaver y van der Meer, 1993; Tahri et al., 1995), y además, la presencia de sales biliares desconjugadas (ácido cólico) puede inducir un incremento en la permeabilidad de la membrana celular, alterando su porosidad, lo que permitiría un incremento de la toma de colesterol del medio (Lye et al., 2010b).

1.3.3.3. Metabolismo de colesterol por los probióticos

El colesterol presente en el lumen de organismos mamíferos puede ser metabolizado a coprostanol por la flora intestinal (Figura 1.24). Este derivado es absorbido pobremente por el epitelio, por lo que se excreta en las heces y, por tanto,

este proceso asociado a la microbiota puede ser responsable de reducir los niveles de colesterol plasmático (Gérard et al., 2004). Las poblaciones bacterianas que podrían estar implicadas en la degradación de colesterol a coprostanol, en condiciones *in vivo*, no han sido caracterizadas en profundidad. Sin embargo, además de encontrarse en microorganismos no considerados probióticos como *Bacteroides* sp (Gérard et al., 2007), la actividad colesterol reductasa o la capacidad de producir coprostanol, ha sido detectada en algunas cepas de lactobacilos y bifidobacterias (Lye et al., 2010a; Zanotti et al., 2015).

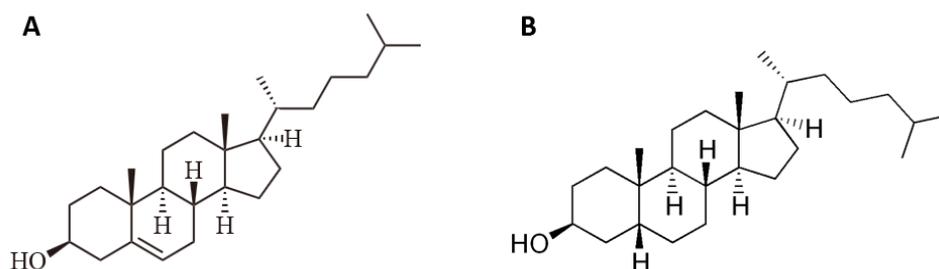


Figura 1.24. Estructuras del colesterol (A) y del coprostanol (B)

Los trabajos científicos que apuntan a que la conversión de colesterol a coprostanol puede ser el mecanismo de acción de probióticos con actividad hipocolesterolemica son escasos. Sin embargo, dado que la actividad colesterol reductasa está presente en el género *Lactobacillus*, no es descartable que esta característica juegue un papel de cierta importancia en la capacidad de algunas cepas probióticas de reducir la absorción de colesterol, directamente o quizá indirectamente modulando la flora intestinal incrementando la población de microorganismos capaces de metabolizar colesterol a coprostanol (Veiga et al., 2005).

Capítulo 2. Objetivos

El presente trabajo se engloba dentro del proyecto de título *Nuevas aplicaciones de cepas probióticas y de compuestos derivados con actividad biológica* (Proyecto POSTBIO), subvencionado por el programa de Incentivos para el fomento de la innovación y el desarrollo empresarial en Andalucía, gestionado por la Agencia IDEA y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. El objetivo general del proyecto es ampliar el potencial de aplicación de los microorganismos probióticos en la prevención de enfermedades o trastornos de la salud, siendo el metabolismo del colesterol uno de los apartados de dicho proyecto.

Niveles elevados de colesterol están asociados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y su tratamiento requiere el empleo de fármacos, con frecuentes efectos secundarios adversos. El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es buscar una alternativa más natural para reducir la absorción del colesterol procedente de la dieta, mediante el empleo de cepas probióticas o compuestos obtenidos a partir de ellas. Con este fin, los hitos planificados en este trabajo fueron los siguientes:

- 1. Crear una colección de muestras a partir de 28 cepas probióticas vivas, inactivadas por distintos tratamientos, metabolitos extraídos a partir de ellas por medio de solventes y compuestos solubles liberados durante su cultivo en medio líquido.**
- 2. Establecer dianas claves en el proceso de absorción del colesterol procedente de la dieta y simular dichas dianas mediante modelos *in vitro* que permitan detectar un posible efecto hipocolesterolémico.**
- 3. Seleccionar aquellas muestras de la colección que resulten efectivas en los modelos *in vitro* definidos anteriormente y hallar el mecanismo de acción mediante el cual las muestras ejercen su efecto hipocolesterolémico.**
- 4. Evaluar la eficiencia de las muestras seleccionadas en un modelo *in vivo* de hipercolesterolemia.**

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos químicos de uso general

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos presentados en esta memoria han sido adquiridos a las siguientes casas comerciales: Agilent Technologies, Bio-Rad, GE Healthcare, Panreac Química S.L.U., Promega, QIAGEN, Scharlab, Sigma-Aldrich y Thermo Fisher Scientific.

3.2. Oligonucleótidos y plásmidos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron sintetizados por la empresa Eurofins Genomics (Alemania) y se especifican en la Tabla 3.1.

El vector plasmídico empleado en algunos ensayos descritos en esta memoria es el vector pGEM[®]-T (Figura 3.1). Se trata de un vector de 3.000 pb (Promega), empleado como vector de clonación de productos de PCR. Gracias a la timidina que posee en sus extremos 3' incrementa la eficiencia de ligación de productos de PCR, amplificados con ADN polimerasas con actividad expandasa, y previene la circularización del vector. Incorpora un gen de resistencia a ampicilina que permite su selección en el hospedador.

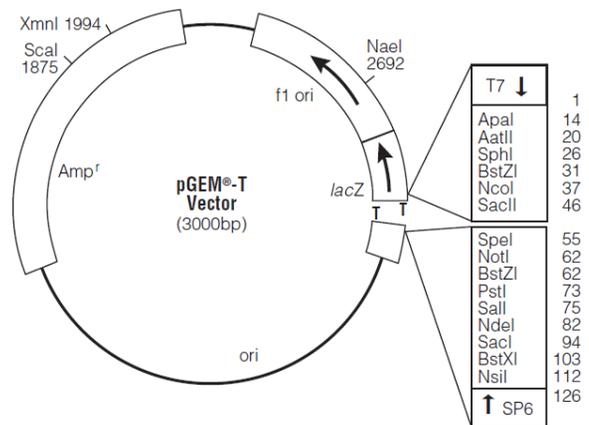


Figura 3.1.
Plásmido de clonación pGEM[®]-T.

Tabla 3.1. Secuencias de oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.

Nombre	Gen	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Orig	Fun.
hNPC1L1_D	NPC1L1	TATGGTCGCCCGAAGCA	55,2	A	1
hNPC1L1_R		TGCGGTTGTTCTGGAAATACTG	58,4		
hGAPDH_Rw	GAPDH	TGAACGGGAAGCTCACTGG	59,4	A	2
hGAPDH_Fw		TCCACCACCTGTTGCTGTA	58,8		
T7	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	53,2	-	3
SP6	SP6	CGATTTAGGTGACACTATAG	53,2		
Primer 1	Adaptador HS*	CTAATACGACTCACTATAGGGC	58,4	-	4
Primer 1 Nested		TCGAGCGGCCGCCGGCAGGT	73,3		
Primer 2R Nested		AGCGTGGTCGCGCCGAGGT	67,6		
GAPDH_Lreu_D	GAPDH	CTCGTAACATTCTTGGGTAAAGAA	59,7	B	2
GAPDH_Lreu_R		TGACCTGAAAGCTTACCGTTTAATT	58,1		
LACTO_D	16 S	CAGAAAGTCACGGCTAACTACGT	60,6	C	
LACTO_R2		TCGCTTTACGCCAATAAATCC	58,4		
HS_integrasa_D	Integrasa	GACTCAAGAATACTTCTAATGGTG	57,6		
HS_integrasa_R		ACTCTCATAGCTGATTTTTGG	54		
HS_transpsse31_D	Transposasa	CAATTTAACAGACCTCATTT	52	B	5
HS_transpsse_31_R		ATGCCGTAAAGTAACGATAAC	54		
HS_transpsse_32_D		CGCACTTAAATGATACCATG	53,2	B	
HS_transpsse32_R		TTATTGGTTGATGGAGCTGT	53,2		
HS_transpsse33_D		ACCACAAACGAGCTGACAAT	55,3	B	
HS_transpsse33_R		CATATGGAGTTGATAGCCT	55,3		
Intg_ExmRNA_D	Integrasa	ATTGTCGCTCTACTAGCGTC	54		
Intg_exmRNA_R		TTAAACAGCTACCGATGAAAG	57,3		
Trans31_ExmRNA_D	Transposasa A	CATTCTTCGATTAACCGGAA	53,2		
Trans31_ExmRNA_R		GACGAGCTTGTTTCTGCTCCGCTG	66,1		
Trans32_ExmRNA_D	Transposasa B	TCGTTGAGCAATATTAGGCC	55,3		
Trans32_ExmRNA_R		GATCCCAAAGTCGGTTGTA	54,5		
Trans33_ExmRNA_D	Transposasa C	CAAGGCCAAAAGCACCAAGG	57,3	B	6
Trans33_ExmRNA_R		ATTTGAAGAAGTGCCGCGG	56,7		
ABC_ExmRNA_D	Transp. ABC	CGTCAAAGGCATCACTCAA	54,5		
ABC_ExmRNA_R		CCAGAACAAGCACTTCAAAT	53,2		
TransNa_ExmRNA_D	Antiporter Na/H ⁺	CTAATCCTGCGCTAGTAGCG	59,4		
TransNa_ExmRNA_R		GGAATCGTTGACCACATCAT	55,3		
GAPDHExmRNA_D	GAPDH	TGTACTACTAGCTGCTTGCA	57,9		
GAPDHExmRNA_R		CAGTACGGTTGTACGCATC	57,3		

Leyenda: *HS (Hibridación substractiva). **Origen:** A, humano; B, *Lactobacillus reuteri* y C, *Lactobacillus* sp. **Función:** 1, Transportador de de colesterol (expresión génica); 2, Gen control (expresión génica); 3, Amplificación de insertos clonados en plásmidos; 4, Amplificación del producto de hibridación substractiva; 5, Elaboración sondas (hibridación de ácidos nucleicos); 6, Comprobación de los resultados del ensayo de hibridación substractiva; y. 7, Enzimas encargadas de lisis celular (expresión génica).

Tabla 3.1 (Cont.). Secuencias de oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.

Nombre	Gen	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Orig	Fun.
Lysin1_LAR1289_D	Autolisina	TCCATTACCCGTACCACTATA	55,9		
Lysin1_LAR1289_R	LAR 1289	ACCAAGGCAACTAACCAGT	54,5		
Lysin2_LAR1322_D	Autolisina	ATATTCATGAGGCATTTCAAA	50,1		
Lysin2_LAR1322_R	LAR 1322	CACGATACTGGGAATGAAAA	53,2		
Holin1D	LRATCC5360	GTTAAGCCAGATGGAACGCTG	59,8	B	7
Holin1R	8_pl024	GGTTGAACTCCAAGCAGGC	59,4		
Holin2D	Lreu_0858	TCAGCATTTTCAAGGAATGGAA	54,7		
Holin2R		GCGTTACTAAACTCCTTGCCGT	60,3		

Leyenda: *HS (Hibridación substractiva). **Origen:** B, *Lactobacillus reuteri*. **Función:** 7, Enzimas encargadas de lisis celular (expresión génica).

3.3. Microorganismos

3.3.1. Cepas bacterianas que componen la colección de muestras

Las 28 cepas empleadas en la búsqueda de actividad hipocolesterolémica que se utilizan en este trabajo se aislaron en los laboratorios de Biosearch S. A., y se pueden agrupar en: (i) cepas comerciales patentadas, cuyas características probióticas han sido analizadas en diversos estudios, y cepas no caracterizadas procedentes de (ii) leche de vaca, (iii) subproductos de la industria alcoholera y (iv) leche humana (Tabla 3.2).

3.3.2. Otras cepas bacterianas

***Micrococcus luteus* CECT 5863.** Cepa utilizada como sustrato de enzimas líticas en zimogramas.

***Escherichia coli* LE392.** Cepa comercial de *E. coli* utilizada para hospedar al fago lambda.

Endura™ ElectroCompetent cells (Lucigen® Corporation). Cepa comercial de *E. coli* competente, empleada para la clonación y amplificación de vectores plasmídicos. Genotipo: *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^R) xyl-5 λ⁻leu mtl-1 F mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻, m_B⁻)*.

Tabla 3.2. Especies bacterianas utilizadas en los ensayos de búsqueda de actividad hipocolesterolémica e identificadas por secuenciación del 16S.

Procedencia	Cepa	Codificación
Cepas comerciales	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	CECT 5711
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 5716
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CECT 5714
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 7261
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 5713
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 7260
	<i>Bifidobacterium breve</i>	CECT 7263
Leche de vaca	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	BT 837
	<i>Lactobacillus casei</i> *	BT 839
	<i>Lactobacillus casei</i> *	BT 840
	<i>Lactobacillus casei</i> *	BT 838
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BT 841
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 8605
	<i>Lactobacillus casei</i> *	BT 835
Industria alcoholera	<i>Lactobacillus reuteri</i>	BT 836
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BT 595
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BT 574
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BT 585
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	BT 584
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	BT 550
	<i>Lactococcus lactis</i>	BT 575
Leche humana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BT 577
	<i>Lactobacillus gasseri</i> *	BT 817
	<i>Lactobacillus fermentum</i> *	BT 819
	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	BT 816
	<i>Bifidobacterium breve</i> *	BT 821
	<i>Bifidobacterium breve</i>	CECT 8606
	<i>Lactobacillus gasseri</i> *	BT 818

*Especie con mayor porcentaje de similitud del gen 16S en bases de datos EMBL-EBI.

3.4. Cultivo de microorganismos

3.4.1. Medios de cultivo bacterianos

Medio Luria Bertani (LB). Medio de cultivo para *E. coli*.

En aquellas ocasiones en que el medio se complementa con el antibiótico ampicilina, el medio se prepara con una concentración de ampicilina de 100 µg/mL, a partir de un stock de ampicilina a 100 mg/mL en agua, filtrado a través de 0,2 µm de tamaño de poro y almacenado protegido de la luz a -20 °C.

Caldo de Man, Rogosa, Sharpe (M.R.S.). Medio de cultivo utilizado para especies del género *Lactobacillus*.

Medio Nutrient Broth/Agar I. Medio de cultivo para el crecimiento de *M. luteus*.

Medio RCM (Reinforced Clostridial Medium). Medio de cultivo empleado para especies del género *Bifidobacterium*.

En la mayor parte de los casos, para el medio MRS líquido (MRS Broth) y RCM sólido (RCM Agar) se utilizaron medios comerciales de la casa Oxoid siguiendo las instrucciones del fabricante para su preparación. En el caso del medio sólido MRS se utilizaron placas petri ya preparadas (MRS Agar, Scharlab).

La composición de los medios de cultivo LB, MRS, Nutrient Broth y RCM, mencionados anteriormente, puede obtenerse en la página de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): <http://www.uv.es/cect>

Medio NZY. Medio de cultivo para la cepa *E. coli* LE392 tras ser infectada por el fago lambda (Tabla 3.3). Para obtener medio sólido se añaden 20 g/L de agar y para su utilización como cobertera se añaden 7 g/L de agar.

Tabla 3.3. Composición del medio NZY

Componente	g/L
Bacto-Casaminoácidos	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
Ajustar pH 7,5	

Medio Terrific Broth (TB). Medio de cultivo para cepas de *E. coli*, que debido a su alta concentración en extracto de levadura permite un mayor crecimiento de la bacteria y aumenta el rendimiento en la extracción de plásmidos (Tabla 3.4). En paralelo se preparan 100 mL de una solución K₂HPO₄ 720 mM y KH₂PO₄ 170 mM. Esta solución y el medio de cultivo se esterilizan por autoclave y se mezclan antes de su uso. Además, la mezcla se complementa con el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, a partir de un stock de ampicilina a 100 mg/mL en agua, filtrado a través de 0,2 µm de tamaño de poro y almacenado protegido de la luz a -20 °C.

Tabla 3.4. Composición del medio TB

Componente	g/L
Bacto-Triptona	12
Extracto de levadura	24
Glicerol	4 mL

La composición de los medios de cultivo, empleados para llevar a cabo los cultivos en medio líquido de los microorganismos probióticos, ha sido desarrollada en los laboratorios de Biosearch S.A. y no se publicará en esta memoria por motivos de confidencialidad, salvo la composición parcial de dos de ellos (medio General y medio CR20), que se considera relevante para la interpretación de los resultados obtenidos (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Medios de cultivo empleados para la obtención de biomasa de los microorganismos probióticos.

Medio de cultivo	Tipo de microorganismo
Bf04	Especies del género <i>Bifidobacterium</i>
C4G-22L	<i>Lactobacillus coryniformis</i> CECT 5711
M40	<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716
20M-44L 2X.	<i>Lactobacillus gasseri</i>
6G-22L 1X.	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 7261
4G-16L 1X.	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713

Medio CR20. Medio líquido empleado en el cultivo de *L. reuteri*. En la Tabla 3.6 se recogen los ingredientes y la concentración que diferencian este medio del medio General

Medio General. Medio líquido universal para el cultivo de bacterias lácticas. En la Tabla 3.7 se recogen los ingredientes y la concentración que diferencian este medio del medio CR20.

Tabla 3.6. Composición parcial del medio CR20

Componente	g/L
Extracto de levadura	44
Maltodextrina	120
K ₂ HPO ₄	0,5

Tabla 3.7. Composición parcial del medio General

Componente	g/L
Extracto de levadura	22
Glucosa	40
K ₂ HPO ₄	2

3.4.2. Crecimiento de cepas bacterianas

Las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* se incubaron a 37 °C durante 16-18 horas en medio MRS Agar en condiciones de anoxia. El cultivo en medio MRS líquido a pequeña escala se realizó en recipientes cerrados (botes Pirex o tubos Falcon) llenos de medio de cultivo e incubando a 37 °C sin agitación.

Las cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* se incubaron a 37 °C durante 16-18 horas en medio RCM agar en condiciones de anoxia. El cultivo en medio Bf04 líquido en poco volumen (hasta 1 L) se realizó en recipientes cerrados (botes Pirex o tubos Falcon) llenos de medio de cultivo incubando a 37 °C sin agitación.

La cepa *E. coli* LE392 fue incubada a 37 °C durante 16-18 horas en medio LB. El cultivo en medio líquido LB suplementado con 0,2 % de maltosa (p/v) se realizó en matraces sin indentaciones (de volumen variable, dependiendo de la cantidad requerida por el protocolo), incubando a 37 °C y 250 rpm durante 16-18 horas.

La cepa *M. luteus* fue incubada a 30 °C durante 16-18 horas en medio Nutrient Broth Agar. El cultivo en medio líquido se realizó en matraces sin indentaciones (de volumen variable, dependiendo del protocolo), incubando a 30 °C y 150 rpm de agitación.

3.5. Creación de la colección de muestras

Se preparó una muestroteca a partir de las 28 cepas bacterianas indicadas en la tabla 3.2, que se completó con 7 tratamientos de inactivación diferentes a los que fueron sometidas dichas cepas, 3 tipos de extracciones empleando biomasa de cada cepa como materia prima y, por último, el sobrenadante de cada uno de los cultivos bacterianos con el fin de obtener una batería de bacterias viables, no viables y

metabolitos que conformaron una colección de 336 muestras de diversas características y cualidades (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Condiciones y tratamientos a los que fueron sometidas las 28 cepas y que generaron la biblioteca de 336 muestras.

Bacterias control	Biomasa del cultivo
	Térmico
	Ácido
	Base
Tratamientos de inactivación	Microondas
	Peróxido de hidrógeno
	Etanol
	Presión
Sobrenadante de cultivo	
	Agua
Extracciones	Etanol
	Acetona

3.5.1. Cultivo de las cepas bacterianas que componen la colección de muestras

A partir de una colonia de cada una de las cepas listadas en la tabla 3.2 se inocularon 75 mL de medio de cultivo líquido (ver apartado 3.4.2), excepto para las bacterias correspondientes al género *Bifidobacterium*, cuyo preinóculo se realizó en un medio cuya composición en lactosa es el doble de la aportada por el medio Bf04. Tras una incubación a 37 °C durante 13-21 horas en condiciones de anoxia, se emplearon estos cultivos como *starter* para iniciar un cultivo de mayor volumen (1,5 L).

El tiempo de incubación de cada uno de los preinóculos, el medio de cultivo, pH y tiempo de cada uno de los cultivos llevados a cabo en fermentadores Biostat®B (B. Braun, Biotech International, Sartorius) se resumen en la tabla 3.9.

3. Materiales y Métodos

Tabla 3.9. Tiempo de incubación de los preinóculos y condiciones de cultivo llevadas a cabo para cada una de las cepas de la colección.

Cepa	Tiempo Pre-inóculo (h)	Condiciones de cultivo		
		Medio	pH	Tiempo (h)
<i>L. coryniformis</i> CECT 5711	14	C4G-22L	6	15
<i>L. fermentum</i> CECT 5716	12	M40	5	17
<i>L. gasseri</i> CECT 5714	14	20M-44L 2X	4,5	10,5
<i>L. salivarius</i> CECT 7261	14	6G-22L 1X	6	10
<i>L. salivarius</i> CECT 5713	14	4G-16L-1X	5	10
<i>L. reuteri</i> CECT 7260	10	CR20	5	14,5
<i>B. breve</i> CECT 7263	21	Bf04	5,5	18
<i>P. pentosaceus</i> BT 837	14	General	6	10
<i>L. casei</i> BT 839	14	General	6	10
<i>L. casei</i> BT 840	14	General	6	10,5
<i>L. casei</i> BT 838	14	General	6	11,5
<i>L. plantarum</i> BT 841	14	General	6	10
<i>L. reuteri</i> CECT 8605	21	General	6	16
<i>L. casei</i> BT 835	14	General	6	11
<i>L. reuteri</i> BT 836	14	General	6	10
<i>L. plantarum</i> BT 595	14	General	6	9,5
<i>L. plantarum</i> BT 574	14	General	6	10
<i>L. rhamnosus</i> BT 585	14	General	6	9,5
<i>L. fermentum</i> BT 584	13	General	6	9
<i>L. paracasei</i> BT 550	13	General	6	10
<i>L. lactis</i> BT 575	13	General	6	10
<i>L. mesenteroide</i> BT 577	13	General	6	10
<i>L. gasseri</i> BT 817	14	20M-44L 2X	4,5	13
<i>L. fermentum</i> BT 819	14	General	6	12
<i>L. plantarum</i> BT 816	13	General	6	10
<i>B. breve</i> BT 821	23	Bf04	5,5	17
<i>B. breve</i> CECT 8606	23	Bf04	5,5	18
<i>L. gasseri</i> BT 818	14	20M-44L 2X	4,5	13

La concentración de bacterias viables (Tabla 3.10) en cada cultivo se determinó mediante diluciones seriadas en agua de peptona tamponada y siembra en medio sólido y por triplicado (medio RCM para bacterias del género *Bifidobacterium* y MRS para el resto).

Tabla 3.10. Concentración de células viables obtenida en el cultivo a escala de laboratorio de cada una de las cepas que componen la colección de muestras.

Cepa	Código	Viabilidad (ufc/mL)
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	CECT 5711	$5,80 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 5716	$7,20 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus gasseri</i>	CECT 5714	$6,10 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 7261	$1,10 \cdot 10^{10}$
<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 5713	$5,60 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 7260	$6,10 \cdot 10^9$
<i>Bifidobacterium breve</i>	CECT 7263	$8,90 \cdot 10^9$
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	BT 837	$2,50 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus casei</i>	BT 839	$4,90 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus casei</i>	BT 840	$1,10 \cdot 10^{10}$
<i>Lactobacillus casei</i>	BT 838	$4,70 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BT 841	$1,40 \cdot 10^{10}$
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 8605	$6,10 \cdot 10^8$
<i>Lactobacillus casei</i>	BT 835	$1,60 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus reuteri</i>	BT 836	$1,60 \cdot 10^{10}$
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BT 595	$4,60 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BT 574	$8,80 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BT 585	$5,40 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus fermentum</i>	BT 584	$1,60 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus paracasei</i>	BT 550	$8,30 \cdot 10^9$
<i>Lactococcus lactis</i>	BT 575	$1,50 \cdot 10^{10}$
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BT 577	$6,10 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus gasseri</i>	BT 817	$2,10 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus fermentum</i>	BT 819	$5,70 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BT 816	$1,10 \cdot 10^{10}$
<i>Bifidobacterium breve</i>	BT 821	$1,10 \cdot 10^{10}$
<i>Bifidobacterium breve</i>	CECT 8606	$5,50 \cdot 10^9$
<i>Lactobacillus gasseri</i>	BT 818	$1,60 \cdot 10^9$

3.5.2. Preparación de la colección de muestras

a. Células vivas: Una vez obtenidos los cultivos de cada microorganismo en las condiciones especificadas en la tabla 3.9, se procedió a concentrar el cultivo 20 veces mediante centrifugación a 8.000 g en tampón PBS^A. A continuación, se añadió Glucidex 19 (Roquette Frères S.A.) al 20 % en proporción 1:1 y se conservaron a -20 °C.

b. Sobrenadantes: 75-100 mL de los cultivos se emplearon para aislar el sobrenadante mediante centrifugación (11.000 g durante 15 minutos). Una vez descartadas las células bacterianas, la muestra se liofilizó en un liofilizador LyoAlfa 20 (Telstar). El producto se resuspendió en Glucidex 19 al 10 % en PBS^A a 1/10 del volumen inicial.

c. Inactivación térmica: Muestras preparadas de forma similar a las células vivas fueron autoclavadas durante 20 minutos a 120 °C y almacenadas a -20 °C.

d. Inactivación con ácido fuerte: las suspensiones bacterianas vivas concentradas (10 mL) se incubaron en de H₂SO₄ 80 mM a 55 °C durante 4 horas y, por último, se neutralizó el ácido con NaOH.

e. Inactivación con base fuerte: 10 mL de células vivas concentradas se trataron con NaOH 80 mM, se incubó a 55 °C durante 4 horas y se neutralizó con H₂SO₄.

f. Inactivación mediante microondas: se sometió a 10 mL del concentrado de bacterias vivas a una rampa de potencia durante 3 minutos hasta llegar a los 300 W en un microondas de laboratorio (Multiwave 3000, Anton Paar) y, una vez alcanzada dicha potencia, se mantuvo en esas condiciones durante 5 minutos más.

g. Inactivación mediante peróxido de hidrógeno: en esta ocasión 10 mL del concentrado de células vivas se incubaron con 480 µL de H₂O₂ al 30 % durante 1 hora a 37 °C. Para eliminar el H₂O₂ se añadieron 140 µL de catalasa (6,7 mg proteína/mL).

h. Inactivación mediante etanol: se mezclaron 10 mL del concentrado con 10 mL de etanol al 96 % y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Por último, se eliminó el etanol en un evaporador (Savant SPD121P Speed Vac, DJB labcare).

i. Inactivación mediante presión: se sometió a 10 mL del concentrado a una presión de 2.000 bar en un homogeneizador Microfluidizer M-11P (Microfluidics), manteniendo la muestra refrigerada y procesando cada muestra 9 veces, lo que equivale a una recirculación de 10 minutos.

j. Extractos libres de células: aparte de los tratamientos de inactivación ya descritos, se procedió a realizar extracciones con 3 solventes distintos a partir de células vivas de cada una de las cepas, a fin de obtener metabolitos intracelulares y ampliar la variedad de muestras en nuestra colección.

Se utilizó un procedimiento de extracción acelerada por solventes (Dionex ASE200, Dionex Corporation) utilizando unas condiciones estándar de extracción: 1.500 PSI de presión y una temperatura de 50 °C durante 10 minutos y tres solventes de distinta polaridad: agua, etanol y acetona.

Para la obtención de cada extracto, se partió de 10 mL del concentrado de biomasa de células vivas. A continuación, el pellet se mezcló con arena de mar lavada (Panreac Química S.L.U.) y se sometió a dos ciclos de extracción, eluyendo siempre en el mismo vial. Tras la extracción, el extracto obtenido se evaporó en horno de vacío a 50 °C (Binder). El residuo seco se disolvió en PBS^A a 50 mg/mL y se conservó a -20 °C.

3.5.3. Preparación de las muestras para ensayos de actividad hipocolesterolémica

Una vez obtenidas las muestras, mediante los protocolos descritos en el apartado 3.5.2, se procedió a estandarizar su concentración para su uso en los ensayos de búsqueda de actividad hipocolesterolémica.

3. Materiales y Métodos

Tabla 3.11. Colección de muestras que componen la muestroteca empleada en la búsqueda de compuestos con actividad hipocolesterolémica: control vivo y los 7 tratamientos de inactivación.

Cepa	Control	Térmic	Ácido	Base	Microon.	H ₂ O ₂	Etanol	Presión
<i>L. coryniformis</i>	CECT 5711	MPB028	MPB055	MPB082	MPB109	MPB136	MPB163	MPB190
<i>L. fermentum</i>	CECT 5716	MPB029	MPB056	MPB083	MPB110	MPB137	MPB164	MPB191
<i>L. gasseri</i>	CECT 5714	MPB030	MPB057	MPB084	MPB111	MPB138	MPB165	MPB192
<i>L. salivarius</i>	CECT 7261	MPB031	MPB058	MPB085	MPB112	MPB139	MPB166	MPB193
<i>L. salivarius</i>	CECT 5713	MPB032	MPB059	MPB086	MPB113	MPB140	MPB167	MPB194
<i>L. reuteri</i>	CECT 7260	MPB033	MPB060	MPB087	MPB114	MPB141	MPB168	MPB195
<i>B. breve</i>	CECT 7263	MPB034	MPB061	MPB088	MPB115	MPB142	MPB169	MPB196
<i>P. pentosaceus</i>	BT 837	MPB035	MPB062	MPB089	MPB116	MPB143	MPB170	MPB197
<i>L. casei</i>	BT 839	MPB036	MPB063	MPB090	MPB117	MPB144	MPB171	MPB198
<i>L. casei</i>	BT 840	MPB037	MPB064	MPB091	MPB118	MPB145	MPB172	MPB199
<i>L. casei</i>	BT 838	MPB038	MPB065	MPB092	MPB119	MPB146	MPB173	MPB200
<i>L. plantarum</i>	BT 841	MPB039	MPB066	MPB093	MPB120	MPB147	MPB174	MPB201
<i>L. reuteri</i>	CECT 8605	MPB040	MPB067	MPB094	MPB121	MPB148	MPB175	MPB202
<i>L. casei</i>	BT 835	MPB041	MPB068	MPB095	MPB122	MPB149	MPB176	MPB203
<i>L. reuteri</i>	BT 836	MPB042	MPB069	MPB096	MPB123	MPB150	MPB177	MPB204
<i>L. plantarum</i>	BT 595	MPB043	MPB070	MPB097	MPB124	MPB151	MPB178	MPB205
<i>L. plantarum</i>	BT 574	MPB044	MPB071	MPB098	MPB125	MPB152	MPB179	MPB206
<i>L. rhamnosus</i>	BT 585	MPB045	MPB072	MPB099	MPB126	MPB153	MPB180	MPB207
<i>L. fermentum</i>	BT 584	MPB046	MPB073	MPB100	MPB127	MPB154	MPB181	MPB208
<i>L. paracasei</i>	BT 550	MPB047	MPB074	MPB101	MPB128	MPB155	MPB182	MPB209
<i>L. lactis</i>	BT 575	MPB048	MPB075	MPB102	MPB129	MPB156	MPB183	MPB210
<i>Le. mesenteroides</i>	BT 577	MPB049	MPB076	MPB103	MPB130	MPB157	MPB184	MPB211
<i>L. gasseri</i>	BT 817	MPB050	MPB077	MPB104	MPB131	MPB158	MPB185	MPB212
<i>L. fermentum</i>	BT 819	MPB051	MPB078	MPB105	MPB132	MPB159	MPB186	MPB213
<i>L. plantarum</i>	BT 816	MPB052	MPB079	MPB106	MPB133	MPB160	MPB187	MPB214
<i>B. breve</i>	BT 821	MPB053	MPB080	MPB107	MPB134	MPB161	MPB188	MPB215
<i>B. breve</i>	CECT 8606	MPB054	MPB081	MPB108	MPB135	MPB162	MPB189	MPB216
<i>L. gasseri</i>	BT 818	MPB326	MPB327	MPB328	MPB329	MPB330	MPB331	MPB332

Tabla 3.12. Colección de muestras que componen la muestroteca empleada en la búsqueda de compuestos con actividad hipocolesterolémica: sobrenadantes de medio de cultivo y extracciones con 3 solventes distintos.

Cepa	Sobren.	ExtAgua	ExEtanol	ExAceto
<i>L. coryniformis</i> CECT 5711	MPB217	MPB244	MPB271	MPB298
<i>L. fermentum</i> CECT 5716	MPB218	MPB245	MPB272	MPB299
<i>L. gasseri</i> CECT 5714	MPB219	MPB246	MPB273	MPB300
<i>L. salivarius</i> CECT 7261	MPB220	MPB247	MPB274	MPB301
<i>L. salivarius</i> CECT 5713	MPB221	MPB248	MPB275	MPB302
<i>L. reuteri</i> CECT 7260	MPB222	MPB249	MPB276	MPB303
<i>B. breve</i> CECT 7263	MPB223	MPB250	MPB277	MPB304
<i>P. pentosaceus</i> BT 837	MPB224	MPB251	MPB278	MPB305
<i>L. casei</i> BT 839	MPB225	MPB252	MPB279	MPB306
<i>L. casei</i> BT 840	MPB226	MPB253	MPB280	MPB307
<i>L. casei</i> BT 838	MPB227	MPB254	MPB281	MPB308
<i>L. plantarum</i> BT 841	MPB228	MPB255	MPB282	MPB309
<i>L. reuteri</i> CECT 8605	MPB229	MPB256	MPB283	MPB310
<i>L. casei</i> BT 835	MPB230	MPB257	MPB284	MPB311
<i>L. reuteri</i> BT 836	MPB231	MPB258	MPB285	MPB312
<i>L. plantarum</i> BT 595	MPB232	MPB259	MPB286	MPB313
<i>L. plantarum</i> BT 574	MPB233	MPB260	MPB287	MPB314
<i>L. rhamnosus</i> BT 585	MPB234	MPB261	MPB288	MPB315
<i>L. fermentum</i> BT 584	MPB235	MPB262	MPB289	MPB316
<i>L. paracasei</i> BT 550	MPB236	MPB263	MPB290	MPB317
<i>L. lactis</i> BT 575	MPB237	MPB264	MPB291	MPB318
<i>Le. mesenteroides</i> BT 577	MPB238	MPB265	MPB292	MPB319
<i>L. gasseri</i> BT 817	MPB239	MPB266	MPB293	MPB320
<i>L. fermentum</i> BT 819	MPB240	MPB267	MPB294	MPB321
<i>L. plantarum</i> BT 816	MPB241	MPB268	MPB295	MPB322
<i>B. breve</i> BT 821	MPB242	MPB269	MPB296	MPB323
<i>B. breve</i> CECT 8606	MPB243	MPB270	MPB297	MPB324
<i>L. gasseri</i> BT 818	MPB333	MPB334	MPB335	MPB336

Las muestras vivas y las obtenidas por tratamientos de inactivación se llevaron a una concentración final de $5 \cdot 10^9$ bacterias/mL con PBS^A, teniendo en cuenta la viabilidad obtenida al final de cada cultivo (Tabla 3.10). Los extractos se emplearon a la concentración del stock (50 mg/mL) y los sobrenadantes del cultivo se diluyeron 10 veces con PBS^A. Una vez estandarizadas todas las muestras se distribuyeron por triplicado de manera aleatoria en placas de 96 pocillos.

De esta forma obtuvimos una colección formada por 336 muestras, vivas e inactivadas (Tabla 3.11), sobrenadantes de sus cultivos celulares y sus metabolitos obtenidos con 3 solventes diferentes (Tabla 3.12), codificadas y distribuidas en 12 placas (Tablas 3.11 y 3.12).

3.6. Cultivos celulares

3.6.1. Líneas celulares

Las células seleccionadas para llevar a cabo la búsqueda de muestras con actividad hipocolesterolémica pertenecen a las líneas celulares de enterocitos HT-29, Caco-2 (ambas líneas son células humanas procedentes de carcinoma de colon) y DIEC (*Dog Intestinal Epithelial Cell*, células del epitelio intestinal de perro).

Las líneas celulares empleadas en los ensayos de citotoxicidad, debido a su rápido crecimiento en placa, fueron RAW 264.7 (macrófagos de ratón), 3T3L1 (preadipocitos de ratón) y L929 (fibroblastos de ratón).

Las líneas celulares DIEC y 3T3L1 fueron adquiridas a la *American Type Culture Collection* (ATCC) y el resto de líneas celulares fueron suministradas por el banco de células del Centro de Instrumentaciones Científicas (CIC) de la Universidad de Granada.

3.6.2. Condiciones y medios de cultivo

El cultivo de todas las líneas celulares, así como los ensayos que se realizaron con ellas, se llevó a cabo incubando a 37 °C en condiciones de 95 % de humedad y 5 % de CO₂ en un incubador BBD 6220 (Heraeus; Tabla 3.13).

Cada uno de los cultivos celulares se inició a partir de un vial de células conservado en nitrógeno líquido. Los cultivos se mantuvieron hasta alcanzar un 80 % de confluencia, renovando el medio de cultivo cada 2-3 días. En ese momento, se recogieron las células mediante tratamiento químico con Tripsina-EDTA^A (salvo las células RAW 264.7, que se recogen por disgregación mecánica) y se centrifugaron (1.500 rpm durante 5 minutos) para eliminar el medio de cultivo agotado. Para continuar el cultivo, se inocularon nuevos frascos aplicando un factor de dilución de 1/20 a los concentrados celulares empleados como inóculo.

Tabla 3.13. Medios de cultivo de las líneas celulares empleadas en esta memoria

Línea celular	Medio base	Suplementos (%)									
		FBS	L-Glutamina	Aminoácidos no esenciales	Piruvato sódico	HEPES	Lidrocortisón	EGCS	Insulina	Galactosa (mM)	
HT-29	Estándar	DMEM	10	1	1	-	-	-	-	-	-
	Especial*	MEME	10	1	1	1	-	-	-	-	5
Caco-2	MEME	20	1	1	1	-	-	-	-	-	
DIEC	OptiMEN	4	1	-	-	1	0,015	0,02	1	-	
RAW 264.7	DMEM	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
3T3L1	DMEM	10 ^{**}	-	-	-	-	-	-	-	-	
L929	DMEM	10	1	-	-	-	-	-	-	-	

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 1 % (v/v) de penicilina/estreptomina, salvo el medio de las células DIEC, en cuyo caso, es un 0,5 % (v/v). *Medio de HT-29 especial para promover la diferenciación apico-basolateral. **10 % de suero de ternera inactivado por calor (CS). NOTA: FBS = Suero fetal bovino inactivado por calor; EGCS = Suplemento para crecimiento de células endoteliales.

Cuando se requirió emplear placas de cultivo, se sembraron a una densidad de $1 \cdot 10^4$ células por pocillo (placas de 96 pocillos) o $6 \cdot 10^4$ células por pocillo (placas de 24 pocillos). Las líneas celulares HT-29 y Caco-2 se cultivaron en placa durante 14 días, 7 días DIEC y 3 días el resto de líneas (RAW 264.7, 3T3L1 y L929).

3.7. Búsqueda de muestras con actividad hipocolesterolémica

3.7.1. Puesta a punto y protocolo para la medida de actividad colesterol esterasa

La evaluación de la actividad inhibitoria de la colesterol esterasa (EC 3.1.1.13) se llevó a cabo midiendo la actividad hidrolasa de dicha enzima sobre el sustrato cromogénico 4-nitrofenilbutirato (4-NPB). Este método se basa en la capacidad de dicha enzima de hidrolizar enlaces éster (Figura 3.2), como el que presenta el 4-NPB (Stout et al., 1985).

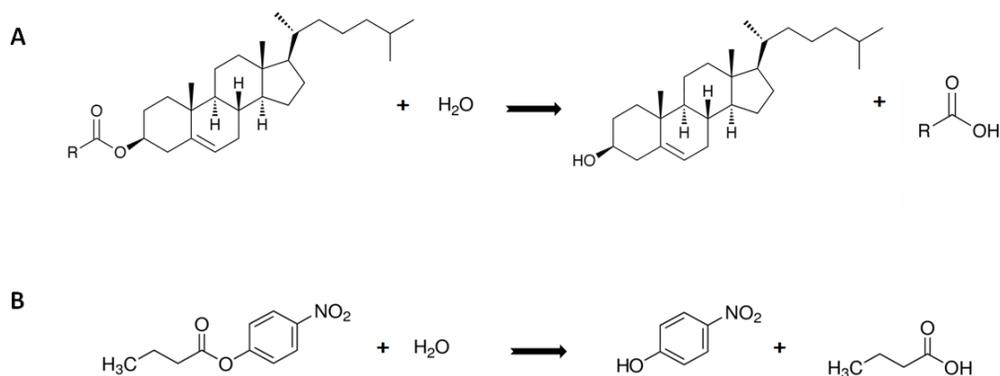


Figura 3.2. Comparación entre la actividad hidrolasa de la enzima colesterol esterasa sobre los ésteres de colesterol (A) y el 4-Nitrofenilbutirato (B).

Para determinar la concentración idónea de sustrato y enzima, así como el tiempo de reacción, se analizaron 10 concentraciones de enzima (1,225 - 0,002 U/mL) y 4 concentraciones de sustrato (5, 2,5, 1,25 y 0,625 mM), en placas *microtiter* de fondo

plano, en un volumen de reacción de 200 μL con tampón fosfato sódico (TPNa^{A}). La reacción se prolongó durante 23 minutos y se midió absorbancia a 415 nm a intervalos de 35 segundos en un lector de placas Microplate Reader 550 (Bio-Rad).

Al analizar los resultados se observó que, concentraciones de enzima de 0,038 U/mL o superior, provocaban que la reacción llegara al equilibrio en pocos segundos (Figura 3.3). Sin embargo, estableciendo 0,01 U/mL como concentración de enzima idónea, comprobamos que 2,5 mM de 4-NPB era una concentración de sustrato óptima para obtener una cinética lineal durante 900-1000 segundos de reacción (Figura 3.4).

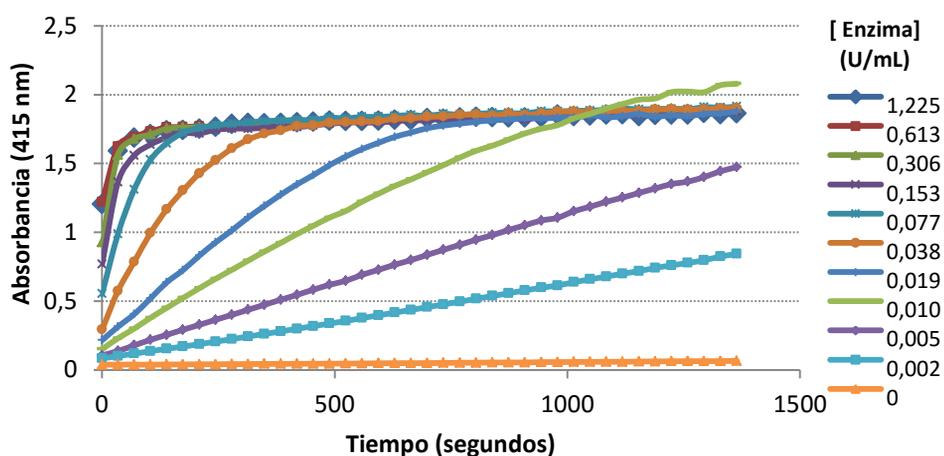


Figura 3.3. Ensayo de diferentes concentraciones de enzima colesterol esterasa (1,225 - 0,002 U/mL) sobre la cinética de hidrólisis de 4-NPB 2,5 mM.

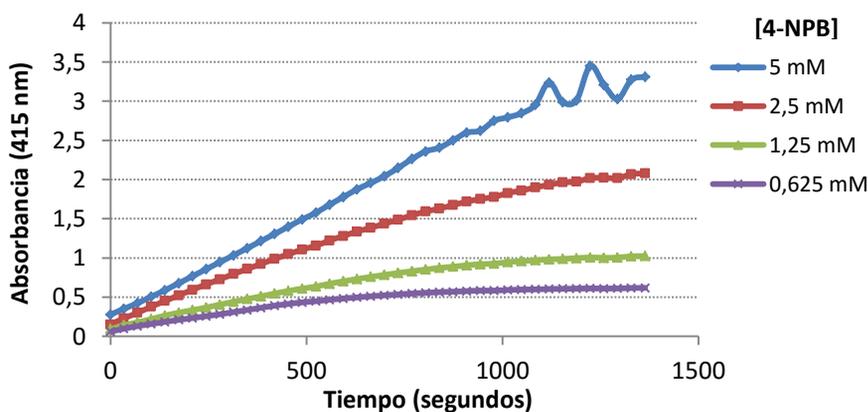


Figura 3.4. Actividad de la enzima colesterol esterasa (0,01 U/mL) sobre diferentes concentraciones de sustrato 4-NPB (5, 2,5, 1,25 y 0,625 mM).

Una vez establecidas las concentraciones de sustrato y enzima idóneas, se probaron dos inhibidores de esta enzima como controles positivos: dietilumberilfosfato (DEUP; Sigma-Aldrich) y 2-(Dietilamino)-6,7-dihidro-4H.5H-ciclopenta[4,5]tieno[2,3-d][1,3]oxacin-4-one o Cholesterol Esterasa Inhibitor 3 (Merck KGaA), ambos disueltos en dimetilsulfóxido. Los mejores resultados se obtuvieron con DEUP en una concentración 0,4 mM, que indujo una inhibición completa de la actividad enzimática (Figura 3.5).

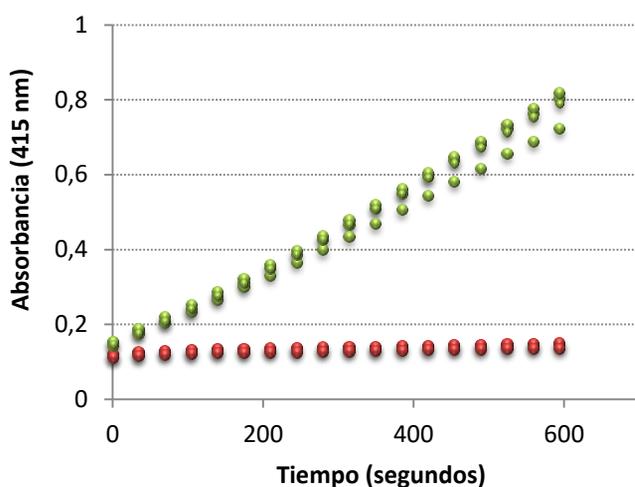


Figura 3.5. Actividad colesterol esterasa en presencia del inhibidor DEUP (●) y en ausencia del mismo (control, ●).

Finalmente comprobamos si la presencia de células bacterianas o restos celulares interferiría en la metodología desarrollada. Para ello, se incubaron 4 concentraciones de 4-nitrofenol (cromóforo resultante de la hidrólisis de 4-NPB por la enzima colesterol esterasa; Figura 3.2) con distintas concentraciones ($5 \cdot 10^9$; 10^9 ; $5 \cdot 10^8$ y 10^8 bacterias/mL) de tres muestras de la colección, por triplicado. Tras una incubación de 15 minutos midiendo absorbancia a 415 nm cada 35 segundos no observamos variaciones significativas de absorbancia entre el inicio y el final de la incubación (Figura 3.6).

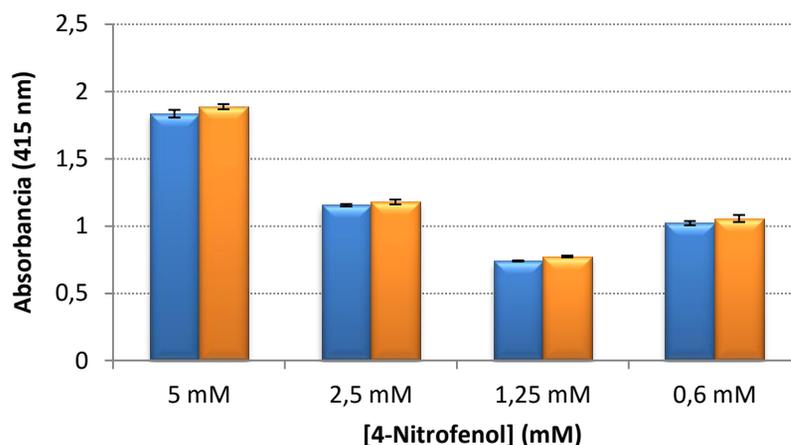


Figura 3.6. Media de la absorbancia obtenida a 415 nm (\pm desviación estándar) de 4 concentraciones 4-nitrofenol en presencia de $5 \cdot 10^8$ bacterias/mL de la muestra MPB325, a tiempo 0 (azul) y tras 15 minutos de incubación (naranja).

Protocolo para la medida de actividad colesterol esterasa

Una vez establecidas las concentraciones de sustrato y enzima idóneas, así como el tiempo de reacción, se establecieron las siguientes condiciones de reacción, empleando la mezcla que se especifica en la tabla 3.14. Las muestras se ensayaron por triplicado, así como PBS^A (Control -), DEUP 4 mM (Control +; disuelto en DMSO) y DMSO (solvente del DEUP). Las reacciones se incubaron durante 600 segundos leyendo absorbancia a 415 nm. La actividad enzimática se calculó en base a la pendiente de la recta $A_{415\text{nm}}$ vs. tiempo.

Tabla 3.14. Mezcla de reacción enzimática

Componente	Volumen (μL)
4-NPB 5 mM*	100
Muestra	20
Enzima 0,2 U/mL [#]	10
TPNa ^A	70

*Preparado fresco en taurocolato sódico 5 mM^A.

[#]Disuelto en TPNa^A

3.7.2. Protocolo y puesta a punto para la medida de actividad hidrolasa de sales biliares (HSB)

La evaluación de la desconjugación de sales biliares por acción de enzimas hidrolasas (HSB) se determinó con el reactivo o-ftalaldehído (OPA). El método se basa en la reacción entre el reactivo OPA y la taurina (uno de los compuestos resultantes de dicha desconjugación; Figura 3.7) en presencia de un agente reductor, como puede ser el β -mercaptoetanol o el ditiotreitol, para producir un compuesto isoindol con un intenso pico de fluorescencia a 475 nm (Mou et al., 2002).

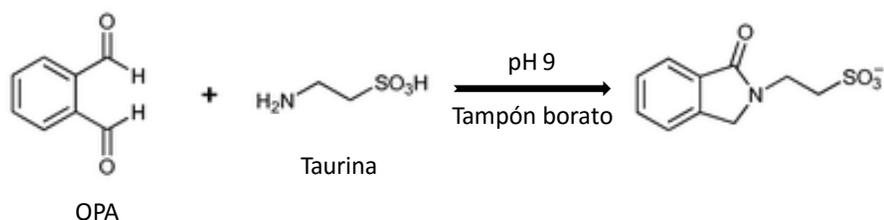


Figura 3.7. Reacción entre el o-ftalaldehído (OPA) y la taurina para producir un compuesto isoindol detectable mediante fluorescencia a 470 nm.

Protocolo para la medida de actividad hidrolasa de sales biliares

La cuantificación de la actividad hidrolasa de sales biliares se llevó a cabo siguiendo el procedimiento adjunto:

1. Incubar 180 μ L de sales biliares (10 mg/mL) con 20 μ L de muestra durante 2 horas a 37 $^{\circ}$ C.
2. Cuantificar la taurina liberada mezclando 10 μ L de la reacción anterior con 100 μ L de reactivo OPA^A. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 2 mL de NaOH y determinar fluorescencia (Ex. 340 nm/Em. 465 nm) en lector GENios (TECAN).

La taurina liberada se calcula interpolando la fluorescencia de cada una de las muestras en la recta de calibrado de taurina (0,16 a 5 mg/mL; Figura 3.8).

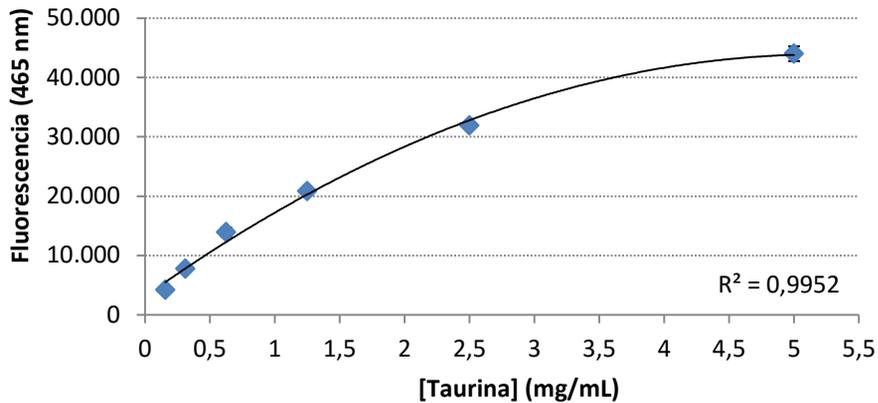


Figura 3.8. Fluorescencia obtenida tras incubar distintas concentraciones de taurina (0,16 – 5 mg/mL) con el reactivo OPA.

Los ensayos de cuantificación de actividad HSB en las muestras de la colección se realizaron por triplicado, expresando los resultados como la media de taurina liberada y el intervalo de confianza de los valores obtenidos.

El método de cuantificación se validó comprobando, por una parte, que la fluorescencia basal debida a diferentes concentraciones de sales biliares (0,16 a 10 mg/mL) no hidrolizadas no interfería en el ensayo (datos no mostrados). Por otro lado, analizamos 6 colonias aisladas de un producto comercial (Primacol®), cuyo fabricante describe que contiene varias cepas de *L. plantarum* con actividad HSB. El método desarrollado permitió detectar esta actividad en 4 aislados (Figura 3.9).

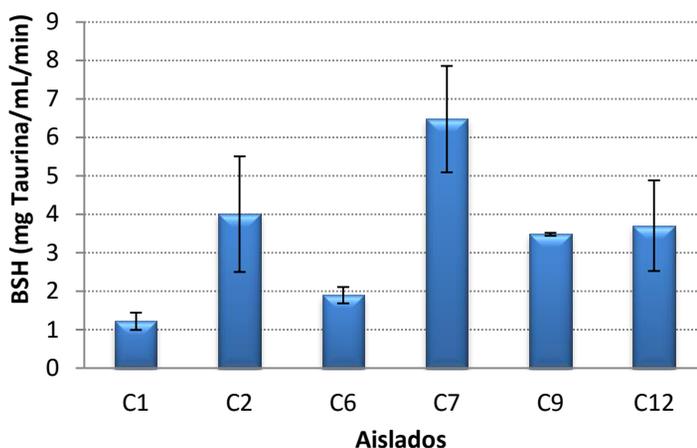


Figura 3.9. Actividad HSB, expresada como mg de taurina liberados por mL y minuto tras la incubación de 6 colonias aisladas de Primacol® con sales biliares (10 mg/mL). Los datos que se representan en la gráfica son la media de dos réplicas y su intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$).

3.7.3. Medida de la citotoxicidad de las muestras de la colección

El análisis del efecto de las muestras de la colección sobre la viabilidad de cultivos celulares de mamífero se realizó en las líneas celulares RAW 264.7, 3T3L1 y L929, debido a su rápido crecimiento, lo que permitió reducir la duración de los ensayos. No obstante, los resultados obtenidos con algunas de las muestras de interés, se confirmaron en ensayos realizados con la línea celular de enterocitos humanos HT-29, completamente diferenciados.

El método empleado fue desarrollado por Mosmann (Mosmann, 1983), modificado por Denizot y Lang (Denizot y Lang, 1986) y se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT), soluble y de color amarillo, a un formazán insoluble y de color azul. Esta reducción la realiza la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa y se correlaciona con la funcionabilidad mitocondrial y la viabilidad celular. La citotoxicidad de cada muestra se expresó como el porcentaje de viabilidad que se obtiene mediante la fórmula descrita en la figura 3.10.

$$\% Viabilidad = \frac{DO \text{ células con muestra}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

Figura 3.10. Fórmula para el cálculo de la viabilidad en el ensayo de citotoxicidad.

El procedimiento que se llevó a cabo, para testar el efecto de las muestras que componen la colección sobre la viabilidad de tres líneas celulares (RAW 264.7, 3T3L1 y L929) es el siguiente:

1. Incubar las muestras a ensayar (20 µL) durante 18-24 horas con cultivos confluentes de la línea celular en placas de 96 pocillos y 200 µL de medio de cultivo.
2. Retirar el medio de cultivo y añadir 200 µL de medio de cultivo nuevo y 40 µL de solución de MTT^A. Incubar entre 2-4 horas hasta que se observen los depósitos intracelulares de formazán.

3. Eliminar el medio de cultivo, lavar una vez con PBS^A y disolver los depósitos con 100 μ L de solución de desteñido^A, en agitación, durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.
4. Medir absorbancia a 595 nm (con referencia a 630 nm) en un espectrofotómetro de placas Microplate Reader 550 (Bio-Rad).

3.7.4. Cuantificación de la inhibición de la absorción de fluoresterol en enterocitos

El análogo fluorescente del colesterol, fluoresterol (NBD-Cholesterol, 22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3 β -ol; Invitrogen), es un esteroide sintético que contiene NBD como fluoróforo unido a la cadena alquilo del colesterol (Figura 3.11).

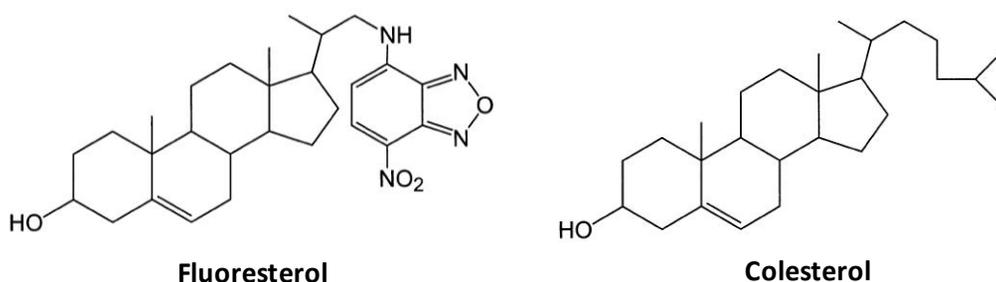


Figura 3.11. Estructuras químicas del fluoresterol y colesterol.

3.7.4.1. Preparación de micelas

Los ensayos de absorción de fluoresterol en enterocitos se llevaron a cabo con dicha molécula fluorescente incorporada en micelas de fosfatidilcolina, con las características descritas en la tabla 3.15. Las micelas se prepararon el día del ensayo a partir de los siguientes stocks conservados a -20 $^{\circ}$ C: 1 mg/ml de fluoresterol (en etanol), 24 mM de fosfatidilcolina (en metanol) y 66 mM de taurocolato sódico (en PBS^A). Para la preparación de 1 mL de micelas, se mezclaron 250 μ L de fosfatidilcolina 24 mM y 100 μ L

de fluoresterol 1 mg/mL, se eliminaron los alcoholes por evaporación con una corriente de nitrógeno, y el residuo obtenido se resuspendió en 333 μ L de taurocolato 66 mM y se completó el volumen hasta 1 mL con PBS^A.

Tabla 3.15. Resumen de las 2 concentraciones de fluoresterol empleadas en los ensayos de absorción de fluoresterol en cultivos celulares.

	A	B
Fluoresterol (μ g/mL stock)	100	10
Fluoresterol/micela (μ g/mg)	≈ 10	≈ 1
Fluoresterol/reacción (μ g/mL)	5	0,5

3.7.4.2. Cuantificación de la absorción de fluoresterol

Los ensayos de absorción de fluoresterol se llevaron a cabo con cultivos de enterocitos diferenciados en placas de 96 pocillos. Las muestras (20 μ L) se incubaron con los cultivos celulares durante 24 horas, y transcurrido este periodo se añadieron 10 μ L de micelas de fluoresterol (100 μ g/mL generalmente) prolongando la incubación 2 horas más. Por último, tras eliminar el medio de cultivo y lavar con PBS^A dos veces, los cultivos se disgregaron con 50 μ L de tripsina-EDTA^A y se resuspendieron en 150 μ L de PBS. La cuantificación del fluoresterol absorbido por parte de los cultivos celulares se llevó a cabo mediante citometría.

Como controles positivos de inhibición de la absorción de fluoresterol se emplearon los siguientes compuestos preparados tal y como se indica: galato de epigallocatequinas (EGCG) 200 mM disuelto en agua destilada, β -sitosterol 1 mg/mL disuelto en etanol absoluto y Ezetimiba (Ezetrol[®]) 1 mg/mL en metanol.

El efecto de cada muestra sobre la absorción de fluoresterol por los cultivos celulares de enterocitos, se realizó por triplicado y los resultados se calcularon como la media de los datos obtenidos \pm el intervalo de confianza con $\alpha = 0,05$. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos, incubando los cultivos celulares con micelas

de fluoresterol, que sirvieron como referencia para calcular el fluoresterol absorbido en condiciones estándar (100 % de absorción).

3.8. Citometría

Los ensayos de citometría se llevaron a cabo empleando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickson) dotado de un láser de ión argón de 15 mW de potencia y emisión a 488 nm. Se analizaron entre 1.000 y 5.000 células de cada muestra y los datos se procesaron con el software cytometer/CELLQuest (Becton Dickson). La fluorescencia celular interna de cada muestra se calculó mediante la media geométrica de la fluorescencia cuantificada en cada evento.

3.8.1. Citometría para análisis de células eucariotas

Para comprobar absorción de fluoresterol por los cultivos celulares de enterocitos, tras la incubación de dichas células con las muestras (ver apartado 3.7.4.2), el citómetro se ajustó a la población celular, con amplificación lineal: dispersión frontal de luz láser (FSC), como medida de tamaño celular, y dispersión lateral de luz láser (SSC), como medida de la complejidad celular, y, con amplificación logarítmica: emisión de fluorescencia a 550-650 (FL2) para detectar fluorescencia debida al fluoresterol.

3.8.2. Citometría para análisis de bacterias

Para comprobar la absorción de fluoresterol por las muestras bacterianas éstas se incubaron a una concentración de 10^9 ufc/mL con fluoresterol (5 μ g/mL), empleando PBS^A como base de la reacción, durante 2 horas a 37 °C, en agitación suave (150 rpm) y oscuridad. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 3.000 g y se realizaron varios lavados con PBS a fin de eliminar restos de micelas de fluoresterol. La detección de células bacterianas mediante citometría se llevó a cabo tiñendo con bromuro de etidio (10 μ g/mL) en tampón de teñido^A, durante 5 min en oscuridad. Posteriormente, se

centrifugó y se lavó 2 veces con PBS. Por último, se analizó la fluorescencia interna de la muestra por citometría de flujo.

El citómetro se ajustó a la población bacteriana, con amplificación logarítmica: dispersión frontal de luz láser (FSC), como medida de tamaño celular, dispersión lateral de luz láser (SSC), como medida de la complejidad celular, emisión de fluorescencia a 560 (FL1), fluorescencia debida al fluoresterol y emisión de fluorescencia a 616 (FL3), fluorescencia debida al bromuro de etidio.

3.9. Microscopía

3.9.1. Microscopía de fluorescencia en cultivos celulares

La internalización del fluoresterol en las células Caco-2, HT-29 y D1EC, se pudo comprobar a los 90 minutos de incubación con fluoresterol (5 µg/mL), mediante microscopía de fluorescencia en un equipo Axiovert 200 de Zeiss. Se utilizó un filtro 09, con longitud de onda de excitación de 450-490 nm y 515 de emisión.

3.9.2. Microscopía confocal

En los ensayos de asimilación de fluoresterol por las muestras bacterianas se incubaron dichas muestras (10^9 ufc/mL) con fluoresterol (5 µg/mL), empleando PBS^A como medio, durante 2 horas a 37 °C, en agitación suave (150 rpm) y en oscuridad. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 3.000 g y se realizaron 3 lavados con PBS a fin de eliminar los restos de micelas de fluoresterol. Por último, se incubaron las muestras con 1 µg/mL de DAPI durante 10 minutos empleando PBS como medio, en un volumen total de 100 µL. Tras centrifugar durante 3 minutos a 3.000 g y realizar 2 lavados con PBS, se añadieron 12 µL de medio de montaje PromoFluor Antiface Reagent (PromoKine) y se visualizó en un microscopio (Microscopio invertido Leica DMI6000), con longitudes de onda de excitación 405 nm y emisión 511-549 nm para DAPI; y excitación a 458 nm y emisión a 511-549 nm para fluoresterol.

3.9.3. Microscopía electrónica

Las fotografías de microscopía electrónica, así como el procesamiento de las muestras para tal fin, se llevaron a cabo por el equipo del Dr. José Manuel Domínguez del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss LEO 906E.

3.10. Manipulación de ácidos nucleicos

3.10.1. Extracción de ARN

Todo el material y reactivos utilizados para la extracción y manipulación de ARN se encontró libre de enzimas nucleasas. Los materiales y equipos se trataron con peróxido de hidrógeno al 30 % (p/p), posteriormente enjuagado con agua libre de ARNasas. Las soluciones acuosas empleadas se trataron con dietilpirocarbonato (DEPC) a una concentración de 0,1 % (v/v) en agitación durante al menos 3 horas, esterilizándose posteriormente en autoclave para degradar el DEPC.

La extracción de ARN a partir de cultivos de células HT-29 se realizó con cultivos en placas de 24 pocillos tras 14 días de incubación. Después de la disgregación de los cultivos con Tripsina-EDTA^A, las células se recogieron y lavaron con PBS^A mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. El pellet de células se suspendió en 1 mL de una solución de tiocianato de guanidina y fenol, TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich) y se almacenó a -80 °C.

En el caso de bacterias, se empleó la biomasa obtenida de 7,5 mL de cultivo; lavada con PBS y conservada a -80 °C. En el momento de la extracción se mezcló con 1 mL de TRI Reagent[®].

A partir de este punto, el protocolo de extracción de ARN es el mismo, independientemente del origen de la muestra, y se basa en la utilización de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987).

1. Al mililitro de TRI Reagent® en el que se encuentra la muestra, se adiciona 200 µL de cloroformo. Se agita vigorosamente con vórtex y se deja reposar 2-3 minutos a temperatura ambiente.
2. Se centrifuga a 12.000 g a 4 °C durante 15 minutos, se recoge la fase superior acuosa y se pasa a un nuevo tubo de 1,5 mL.
3. Se adicionan 250 µL de TRI Reagent® y 50 µL de cloroformo. Se agita vigorosamente con vórtex y se deja reposar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Se centrifuga a 12.000 g y 4 °C durante 15 minutos. Se recoge la fase superior acuosa y se pasa a un nuevo tubo de 1,5 mL.
4. Se repite de nuevo el paso anterior de separación (paso 3).
5. Se precipita el ARN añadiendo 750 µL de isopropanol (0,5 mL de isopropanol por cada 1 mL de TRI Reagent® empleado). Se incuba durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12.000 g y 4 °C durante 10 minutos.
6. Se elimina el sobrenadante y se lava el ARN con 1 mL de etanol 70 % (v/v) en agua-DEPC. Se agita y se centrifuga a 7.500 g y 4 °C durante 5 minutos.
7. Se retira el etanol y se repite el lavado en las mismas condiciones del paso anterior (paso 6).
8. Se retira todo el etanol y se deja secar el pellet a temperatura ambiente durante no más de 10 minutos.
9. Se disuelve el pellet en 43 µL de agua-DEPC y se trata con 10 U de enzima ADNasa I (Roche), para degradar el ADN genómico que pueda quedar en la muestra. Se incuba durante 20 minutos a 37 °C.
10. Se repiten los pasos 3, 5, 6, 7 y 8. Finalmente se resuspende en 30 µL de agua libre de ARNasas (*Molecular Biology Grade Water*, 5 Prime). Una vez disuelto se almacena a -80 °C.

La calidad del ARN purificado se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, comprobando el estado de los fragmentos del ARN ribosómico. La concentración de ARN y presencia de compuestos contaminantes se evaluó mediante espectroscopía UV, asumiendo que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/mL de ARN de hebra sencilla. La proporción entre las lecturas hechas a 260 nm y 280 nm ($OD_{260}:OD_{280}$) se empleó para estimar la pureza de los ácidos nucleicos, con un valor óptimo próximo a 2 para muestras de ARN. Este análisis se realizó con 2 µL de ARN en un equipo NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences).

3.10.2. Retrotranscripción

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), necesario como molde para los ensayos de cuantificación mediante PCR, se utilizaron entre 0,3 – 3 µg de ARN total (dependiendo del ensayo) y el kit *AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis* (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cada reacción de retrotranscripción y teniendo en cuenta el origen de la muestra, eucariota o procariota, se prepararon las mezclas indicadas en la tabla 3.16. Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) durante 5 minutos a 25 °C, posteriormente 45 minutos a 42 °C y, por último, 5 minutos a 95 °C. Las muestras de ADNc obtenidas se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Tabla 3.16. Mezcla de reacción para las reacciones de retrotranscripción

Reactivo	Eucariotas	Procariotas
Master Mix (2X)	10 µL	10 µL
Oligo(dT) primer (0,1 µg/mL)	2,55 µL	-
Random primers (0,1 µg/mL)	0,45 µL	3 µL
AffinityScript RT/RNase block enzyme mixture	1 µL	1 µL
Muestra	0,35 µg	0,5 – 3 µg*
Agua	Hasta 20 µL	Hasta 20 µL

* Dependiendo del ensayo

3.10.3. Aislamiento de ADN genómico bacteriano

Se utilizó el kit comercial *ATPTM Genomic DNA Mini Kit* (ATP biotech Inc.) para procesar muestras de biomasa obtenidas de 1-5 mL de cultivo, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante para bacterias Gram positivas.

Al finalizar la lisis celular y antes de proceder a unir el ADN a la columna, es conveniente tratar las muestras con ARNasa A para eliminar el ARN que pueda quedar tras la lisis. Para ello, se añadieron 5 μ L de ARNasa A^A 10 mg/mL y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37 °C. Al finalizar todo el protocolo, se resuspendió el ADN en 30-50 μ L de tampón de elución previamente calentado a 70 °C, y para un mejor rendimiento de la extracción se pasó el mismo eluido 2 veces por la misma columna. Las muestras se almacenaron a 4 °C para periodos cortos de tiempo o a -20 °C para almacenamientos largos.

Al igual que en las extracciones de ARN, para conocer la concentración de ADN e integridad del mismo se realizó un gel de agarosa al 0,8 %. Asimismo, se comprobó la cantidad de ADN mediante espectrometría UV.

3.10.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En los ensayos de este trabajo se emplearon dos tipos de PCR: la PCR convencional y la PCR a tiempo real. Ambas constan de 3 pasos: desnaturalización a 94 – 96 °C durante 30 – 60 segundos, seguido de una hibridación a 37 – 70 °C durante 30 – 60 segundos, temperatura que se establece en base a 5 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores, y una etapa de extensión a 68 – 72 °C y cuyo tiempo dependerá del tamaño del fragmento a amplificar.

En el caso de la PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR), al final de la PCR se realizó una curva de disociación que resulta de aumentar gradualmente la temperatura de reacción hasta conseguir la desnaturalización total del ADN, finalizando a 95 °C durante 1 min. La lectura de fluorescencia durante este proceso de desnaturalización

permite analizar la temperatura de disociación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño y detectar si hay uno o varios fragmentos amplificados.

En el presente trabajo se ha utilizado la enzima *Taq DNA Polymerase* (5 Prime GmbH) para las PCR convencionales y *Perfecta® SYBR® Green SuperMix, Low ROX™* (Quanta Biosciences) para PCR cuantitativa (qPCR). Las mezclas de reacción para PCR convencionales se incubaron en un equipo iCycler (Bio-Rad), mientras que para qPCR se utilizó un equipo Mx3005P (Agilent Technologies).

3.10.4.1. Análisis por PCR convencional

La detección y amplificación de determinados fragmentos de ADN se llevó a cabo a partir de ADN genómico (ver apartado 3.10.3) y la mezcla de reacción de PCR que se resume en la tabla 3.17.

Tabla 3.17. Mezcla de reacción estándar para PCR convencional.

Componente	Conc. Stock	Volumen (μL)*
Tampón Taq Polimerasa	10x	2
Oligo directo	10 μM	1
Oligo reverso	10 μM	1
dNTPs	10 mM	0,5
Molde ADNc		100 μg
Taq Polimerasa	5 U/μL	0,125

*Volumen total a completar con agua destilada hasta 20 μL.

3.10.4.2. Análisis por PCR cuantitativa

En el análisis de la expresión génica se partió de ADNc sintetizado a partir de ARN total (ver apartado 3.10.2) y la mezcla de reacción de PCR se resume en la tabla 3.18. Las reacciones se estandarizaron utilizando como molde concentraciones similares de ADN complementario.

Tabla 3.18. Mezcla de reacción estándar para el análisis mediante qPCR.

Componente	Conc. Stock	Volumen (μL)*
<i>PerfeCTa</i> [®] <i>SYBR</i> [®] <i>Green SuperMix, Low ROX</i> TM	2x	10
Oligo directo	10 μM	0,4
Oligo reverso	10 μM	0,4
Molde ADNc		150 μg

*Volumen total a completar con agua destilada hasta 20 μL .

Expresión de los resultados en los experimentos de expresión génica

Los análisis de expresión génica se realizaron a partir de los valores Ct obtenidos en los ensayos de amplificación mediante PCR cuantitativa (apartado 3.10.4.2). Se empleó el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Pfaffl, 2001) que permite determinar la expresión relativa de un gen concreto en dos condiciones de ensayo (control y con tratamiento), normalizando la expresión de dicho gen en relación con los valores de expresión de genes control (Tabla 3.19). En nuestros experimentos seleccionamos el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa como control, tanto para los ensayos con células procariotas como con eucariotas.

Los datos de expresión génica se normalizaron mediante transformación logarítmica y se recurrió al método descrito por Willems (Willems et al., 2008) para el tratamiento de datos obtenidos en distintos ensayos.

Tabla 3.19. Cálculos para la expresión génica relativa

Ct grupo tratado	Gen estudio	Ct_{mA}
	Gen control	Ct_{cA}
Ct grupo control	Gen estudio	Ct_{mB}
	Gen control	Ct_{cB}
ΔCt	Grupo tratado	$\Delta\text{Ct}_{\text{t}} = \text{Ct}_{\text{mA}} - \text{Ct}_{\text{cA}}$
	Grupo control	$\Delta\text{Ct}_{\text{c}} = \text{Ct}_{\text{mB}} - \text{Ct}_{\text{c}}$
$\Delta\Delta\text{Ct}$		$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{t}} - \Delta\text{Ct}_{\text{c}}$
Expresión relativa		$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

3.11. Hibridación substractiva

La hibridación substractiva por supresión (SSH) es una metodología molecular empleada para identificar genes que se expresan diferencialmente (Diatchenko et al., 1996) en dos muestras distintas. De forma general, el procedimiento consiste en hibridar moléculas de ADNc provenientes de la muestra prueba (*tester*) con un exceso de ADNc proveniente de una muestra control (*driver*). El ADNc *tester* estará marcado con unos adaptadores que permiten separar los híbridos entre ambas condiciones (*tester-driver*), que son los genes que se expresan en ambos casos, de los genes (*tester-tester*) que sólo se expresan en una de las condiciones (en la muestra prueba denominada *tester*) y que gracias a los adaptadores se amplifican mediante PCR (Figura 3.12).

3.11.1. Aislamiento de ARN_{total}

El ARN total se aisló como se especifica en el apartado 3.10.1. Una vez extraído se disolvieron 3 µg de ARN_{total} en un volumen total de 3 µL de agua libre de ARNasas (5 Prime). Estas muestras de ARN se emplearon como sustrato para los procedimientos indicados por el fabricante del kit *PCR-Select™ cDNA subtraction* (Clontech Laboratories).

3.11.2. Síntesis de ADNc de doble hebra

En este paso sintetizamos el ADNc correspondiente al *tester* y *driver* a partir del ARN aislado en el apartado 3.11.1. Debido a que empleamos ARN procariota, utilizamos 1 µL de *Random Primers* (10 µM; AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis, Agilent Technologies), en lugar del *cDNA Synthesis Primer* que proporciona el kit.

Para eliminar todo el ARN que no se retrotranscribió, se trató la muestra, tras calentarla a 70 °C durante 10 minutos, con 1 µL de ARNasa A^A 10 mg/mL y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras resultantes se conservaron a -20 °C.

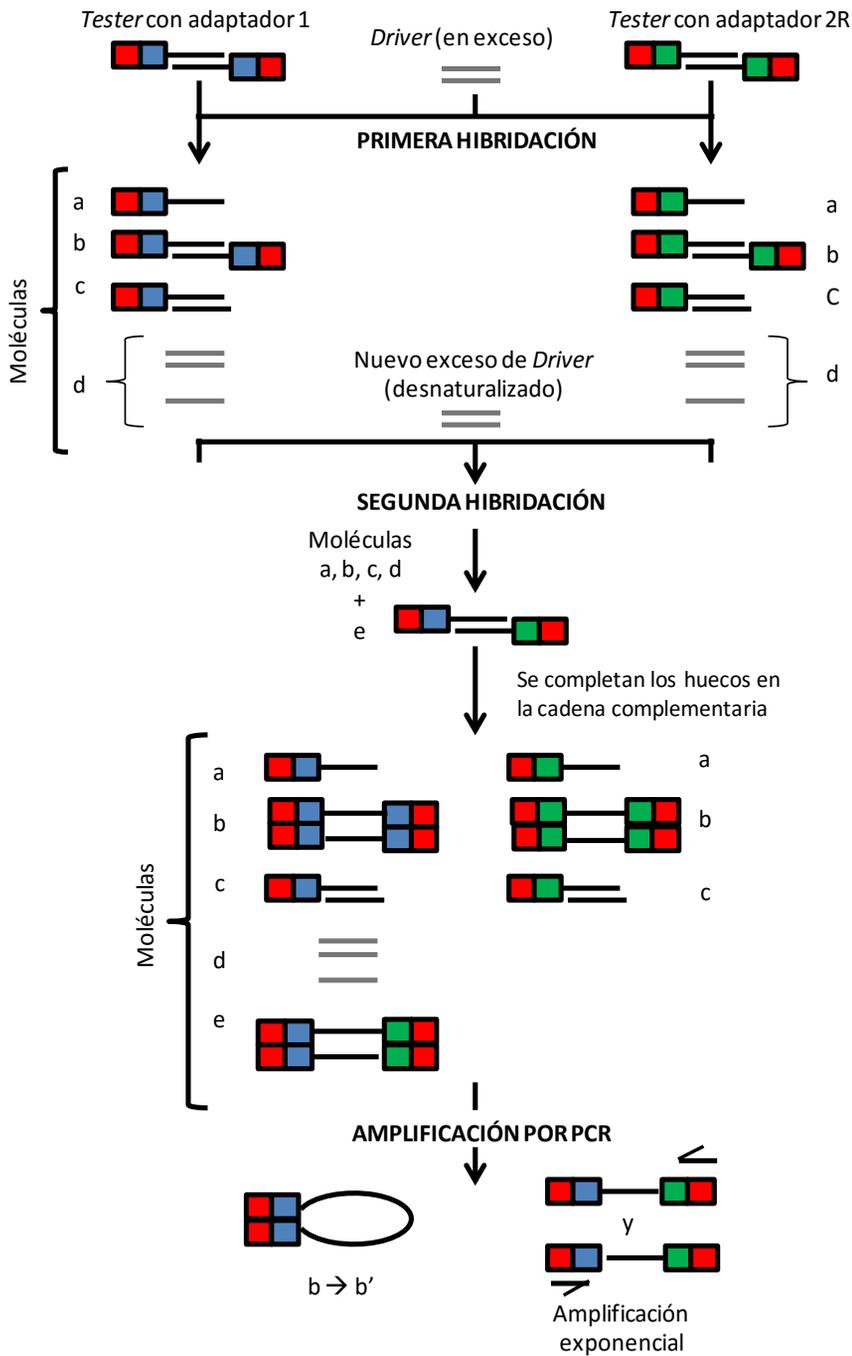


Figura 3.12. Esquema del proceso de hibridación substractiva por supresión (SSH). Las moléculas tipo “e” contienen las secuencias que se sobreexpresan en la condición *tester*. Las líneas sólidas son el resultado de la digestión del ADN complementario, *tester* y *driver*, por la enzima *Rsa* I. Los cuadros de colores representan a los adaptadores, cuyos colores varían dependiendo de los cebadores que amplifican: rojo para *Primer 1*, azul para *Primer 1 Nested* y verde para *Primer 2R Nested*.

3.11.3. Digestión con la enzima *Rsa* I

Tanto la muestra que actúa como *tester* como el *driver* fueron digeridos por la enzima de restricción *Rsa* I. La finalidad es generar fragmentos de ADNc pequeños, y con extremos romos, a los cuales, posteriormente, en el caso de la muestra *tester* se unen los adaptadores.

3.11.4. Unión de adaptadores

La muestra *tester* se dividió en dos alícuotas a las que se ligó un adaptador diferente (adaptador 1 y adaptador 2R). Los extremos de los adaptadores no tienen grupos fosfato, por lo que cada adaptador se unirá solo al extremo 5' de las hebras que componen la doble cadena de ADNc.

3.11.5. Primera hibridación

La primera de las dos hibridaciones sucesivas se llevó a cabo a fin de enriquecer las secuencias que se expresan de manera diferencial en la muestra *tester*. Para ello añadimos ADNc *driver* en exceso a cada una de las alícuotas de la muestra *tester*. A continuación, mediante desnaturalización térmica y enfriamiento, permitimos la hibridación y generación de moléculas *tester-driver*, *tester-tester*, *driver-driver* y hebras de cadena sencilla (Figura 3.12: moléculas c, b, d y a, respectivamente). A pesar del predominio de la hibridación entre *tester-tester*, en la reacción abundan moléculas de ADNc *tester* de cadena sencilla (desemparejadas), que confieren a la mezcla una mayor concentración de secuencias de ADN de hebra sencilla correspondientes a genes expresados en mayor grado en la condición *tester*.

3.11.6. Segunda hibridación

En este paso mezclamos las dos primeras hibridaciones y, de nuevo, exceso de *driver* desnaturalizado, que se une a las moléculas "a" de la figura 3.12, con el objeto de

obtener hebras híbridas que posean el adaptador 1 y el adaptador 2R, correspondiente a aquellos genes que se expresan de forma diferencial (Figura 3.12: moléculas e).

3.11.7. Primera amplificación mediante PCR del producto de las hibridaciones

La primera amplificación por PCR se lleva a cabo con el cebador *Primer 1*, que se une a los dos adaptadores (Tabla 3.20). En este paso se somete a toda la población de moléculas a una supresión por PCR, en la cual sólo amplifican de forma exponencial las secuencias expresadas de forma diferencial. Teniendo en cuenta la figura 3.12, las moléculas “a” y “d” no se amplifican porque no se pueden unir los cebadores; las moléculas “b” no se amplifican exponencialmente, puesto que durante la desnaturalización de la PCR se recircularizarán (figura 3.12, moléculas b’) y a las moléculas “c” sólo se puede unir uno de los adaptadores, por lo que tampoco se amplificarán. Por consiguiente, sólo se produce amplificación exponencial de las moléculas “e”, que poseen ambos adaptadores.

Tabla 3.20. Mezcla de reacción para la primera amplificación por PCR del producto de la segunda hibridación.

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
Agua estéril	10,75
Tampón de reacción de PCR 10X	2,5
Mezcla de dNTP (10 mM)	0,5
<i>Primer 1</i> (10 µM)	1*
Master Taq (5 U/µL) (5 Prime)	0,25

*La reacción control positivo contiene 1 µL de GAPDH_Lreu_D (10 µM) y 1 µL de GAPDH_Lreu_R (10 µM), por lo que se ajusta el volumen al resto de reacciones añadiendo 9,75 µL de agua estéril.

Las reacciones se llevan a cabo con 10 µL de una dilución 1/10 del producto de la segunda hibridación (ver apartado 3.11.6), con agua como control negativo y con ADNc del gen GAPDH (250 µg) como control positivo. La mezcla de reacción (Tabla 3.20) se

sometió a un ciclo de 5 minutos a 75 °C, seguido de otro ciclo de 25 segundos a 94 °C y, por último, 40 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 30 segundos a 66 °C y 1,5 minutos a 72 °C.

3.11.8. Segunda amplificación mediante PCR del producto de las hibridaciones

La segunda amplificación por PCR del producto de la hibridación substractiva se llevó a cabo con los oligos *Nested* para reducir los productos de PCR que puedan interferir en los resultados y enriquecer el producto en secuencias que se expresan de manera diferencial. El proceso se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el kit salvo que se aumentó el número de ciclos de PCR de 12 a 30 ciclos.

Una vez amplificados los fragmentos que se expresan en mayor grado en una condición que en otra, se procedió a clonar dichos fragmentos en un plásmido funcional en *E. coli*.

3.12. Ligación de moléculas de ADN

El resultado de la segunda amplificación por PCR del producto de las hibridaciones (ver apartado 3.11.8) se insertó en vectores pGEM-T a fin de clonar y amplificar dichos fragmentos mediante transformación de *E. coli*. Para ligar los extremos lineales de las moléculas de ADN se utilizó la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche). Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato entre moléculas de ADN de doble cadena. El protocolo es el siguiente:

1. Se mezclan 7 µL del producto de PCR obtenido en el apartado 3.11.8 con 1 µL de vector pGEM-T (50 ng; Promega).
2. Se añade 1 µL de tampón de ligación 10x (Tris-HCl 0,66 M; MgCl₂ 0,05 M; DTT 0,05 M; ATP 0,01M; pH 7,5) y se añade 1 µL de ADN ligasa (1 U/µL; Roche).

3. Se mezclan bien todos los componentes y se da un breve pulso en la centrífuga.
4. Se incuba la reacción durante 12 h a 4 °C.
5. Por último, los productos de esta reacción de ligación son utilizados para transformar células electrocompetentes de la cepa *E. coli Endura*TM.

3.13. Transformación de *E. coli* y obtención de ADN plasmídico

La transformación genética es un proceso en el que un microorganismo capta e incorpora a su dotación genética ADN ajeno. En este caso, el ADN resultante de la hibridación substractiva (ver apartado 3.11) se incorporó a un plásmido como vector de clonación (ver apartado 3.12) y con dicho plásmido se transformó la cepa de *E. coli Endura*TM *ElectroCompetent*.

3.13.1. Transformación de *E. coli* por electroporación

La electroporación es una técnica en la que las células se exponen a campos eléctricos pulsados, de tan solo unos milisegundos, para incrementar su permeabilidad a moléculas de ADN. En este caso, se utilizaron células electrocompetentes comerciales *Endura*TM (Lucigen) y se transformaron con el siguiente protocolo:

1. Se añade 1 µL de ADN, producto de la ligación (ver apartado 3.12) a 25 µL de células electrocompetentes que previamente se han descongelado en hielo.
2. Se transfiere la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) incubada en hielo.
3. Se realiza la electroporación mediante un pulso de 2500 V. La duración del pulso debe ser 4-5 milisegundos para obtener una buena eficiencia de transformación.

4. Se añaden 975 μL de *Recovery Medium* en la cubeta de transformación, se mezcla con la pipeta y se recoge la mezcla en un tubo de 1,5 mL.
5. Se incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h y 250 rpm de agitación.
6. Se siembra la suspensión de células en medio LB sólido con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y se incuban las placas a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 18 – 20 horas.

3.13.2. Detección de colonias portando plásmidos recombinantes

La detección de colonias transformadas con el plásmido pGEM-T portador de insertos, se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos T7 y SP6, que flanquean el sitio de inserción.

Para ello se utilizó como molde 5 μL de suspensiones bacterianas (1 colonia en 20 μL de agua destilada) en reacciones de PCR convencionales con los oligonucleótidos citados a una concentración de 1.000 nM (Tabla 3.21) y un perfil térmico detallado en la tabla 3.22.

Tabla 3.21. Mezcla de reacción de PCR para detección de plásmidos con inserto

Reactivo	Volumen por reacción (μL)
Agua estéril	9,87
Tampón 10 x	2,5
Mezcla dNTP (10 mM)	0,5
Primer T7 (10 μM)	1
Primer SP6 (10 μM)	1
Taq polimerasa (5U/mL)	0,125

Tabla 3.22. Perfil térmico de PCR para detección de plásmidos con inserto.

1 Ciclo	2 min a 95 $^{\circ}\text{C}$
	30 segundos a 95 $^{\circ}\text{C}$
35 Ciclos	30 segundos a 48 $^{\circ}\text{C}$
	30 segundos a 72 $^{\circ}\text{C}$
1 Ciclo	2 min a 72 $^{\circ}\text{C}$

Los amplicones generados se resolvieron en geles de agarosa al 1,5 %. Todos los fragmentos de ADN superiores a 126 pb (amplicón generado por pGEM-T recircularizado como molde), se consideraron procedentes de plásmidos recombinantes, con inserto.

3.13.3. Minipreparaciones de ADN plasmídico (*minipreps*)

El aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala, se llevó a cabo a partir de cultivos de 1 – 2 mL en medio *Terrific Broth* con ampicilina, inoculados con una colonia de *E. coli*, durante 12 horas a 37 °C y 250 rpm de agitación. La purificación de los plásmidos se realizó mediante el kit *NucleoSpin*[®] (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones que facilita el fabricante.

3.14. Purificación de extractos de proteínas

Para extraer proteína de muestras bacterianas, resuspendimos la biomasa en tampón TPK^A 100 mM pH 6 a una concentración de 200 mg/mL en función del peso húmedo de la muestra. A continuación, se lisaron las células con esferas de vidrio en el homogeneizador FastPrep-24 (MP Biomedicals LCC) mediante 10 pulsos de 5 segundos a máxima velocidad. Las esferas de vidrio utilizadas fueron previamente lavadas con ácido para eliminar restos de materia orgánica (incubación en HCl 5,8 M durante 1 hora y lavados extensivos con agua ultra filtrada). Una vez lisadas las células, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la proteína liberada según el método descrito por Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina como patrón.

3.15. Electroforesis de macromoléculas

3.15.1. Electroforesis de ARN

Para analizar las muestras de ARN extraídas (ver apartados 3.10.1 y 3.11.1) se utilizaron geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO-GCT, Pronadisa) al 1 % en tampón TAE

1X (5 Prime). Como marcador de peso molecular se empleó ADN de fago Lambda digerido con *Hind* III (Thermo Fisher Scientific). La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial de 80-100 voltios, durante un tiempo variable en función de la longitud de los fragmentos de ARN esperados, en equipos Mini Sub-Cell GT (Bio-Rad). La visualización de las bandas electroforéticas bajo luz UV se realizó en el equipo Gene Genius Gel Imaging System (Syngene). Esta técnica permite comprobar la presencia de ADN genómico, que se revela como una banda electroforética de peso molecular aparente superior a 25 – 30 kb, así como la concentración y posible degradación de la muestra de ARN.

3.15.2. Electroforesis de ADN

Para analizar las muestras de ADN extraídas en el apartado 3.10.3, así como productos de PCR, utilizamos geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO-GCT Pronadisa) al 0,5 - 1,5 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, en tampón TAE 1X (5 Prime). Como marcadores de peso molecular en la electroforesis utilizamos los siguientes marcadores: 1 kb, III, VIII y 100 pb (Thermo Fisher Scientific) según el ensayo. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial de 80-100 voltios durante un tiempo variable en función de la longitud, el porcentaje de agarosa del gel y el tamaño de los fragmentos de ADN esperado en equipos Mini Sub-Cell GT (Bio-Rad). La visualización de las bandas electroforéticas bajo luz UV se realizó en el equipo Gene Genius Gel Imaging System (Syngene).

3.15.3. Electroforesis de proteínas

3.15.3.1. Geles desnaturalizantes

En el presente trabajo se prepararon dos tipos de geles de proteínas, empleando poliacrilamida como soporte: geles en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y geles en condiciones seminativas para la detección de actividades enzimáticas (zimogramas), ambos al 8 % de poliacrilamida. Para desarrollar dichos geles, cuya composición se

detalla en la tabla 3.23, se utilizó el equipo Mini Protean® 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad) con el tampón de electrodos^A que se indica.

Tabla 3.23. Composición de los geles desnaturalizantes.

Componente	Gel separador [‡]	Gel concentrante
Agua ultra pura	3,3 mL	1,525 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	0,625 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30 %	2,135 mL	0,32 mL
SDS 10 %	80 µL	25 µL
PSA 10 %	80 µL	12,5 µL
TEMED	8 µL	2,5 µL

[‡]Tras añadir el gel separador al molde y para crear un frente recto, se añade isopropanol, una vez polimerizado el gel separador, se elimina el isopropanol y se añade el gel concentrante.

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas de los geles SDS-PAGE, se visualizaron sumergiendo el gel en una solución azul de Coomassie^A durante 30-120 minutos y eliminando el exceso de colorante con solución de desteñido^A.

La masa molecular de las proteínas presentes en las muestras fue determinada por comparación con el marcador molecular SDS-PAGE Unstained Standards Broad Range (Bio-Rad), con un rango de 6.500 a 200.000 Da.

3.15.3.2. Zimogramas

Los geles que se prepararon en condiciones semi-nativas, en ausencia de β -mercaptoetanol y sin hervir las muestras antes de cargarse en el gel. Como indicador de actividad lítica se incorporó al gel separador (Tabla 3.23) *M. luteus* (400 µL de *M. luteus*, 10 mg/mL en PBS^A y autoclavado, para 8 mL de gel). Una vez finalizada la electroforesis, con un voltaje constante de 180 V, los geles se incubaron en 200 mL de TPK^A 50 mM pH 6,5 0,1 % Tritón X-100 durante 14-16 horas para eliminar el SDS y facilitar la

renaturalización de las proteínas. Posteriormente, se tiñeron durante 2 horas con azul de metileno^A y se destiñeron con agua destilada. Las bandas electroforéticas con actividad lítica se muestran en negativo sobre el fondo azul obtenido por tinción de las células de *M. luteus*.

3.16. Transferencia de macromoléculas

3.16.1. Transferencia de ADN mediante vacío (*Southern blot*)

Una vez finalizada la electroforesis en agarosa (ver apartado 3.15.2), la transferencia de las moléculas de ADN se realizó siguiendo este procedimiento:

1. Se sumerge el gel de agarosa en HCl 0,25 N durante 15 min en agitación suave.
2. Se elimina la solución de HCl y se lava el gel varias veces con agua destilada.
3. Se desnaturaliza el gel en una solución de NaOH 0,5 N durante 30 minutos en agitación suave.
4. Se transfiere a una solución SSC 10X^A hasta el momento en el que se transfiere al sistema de vacío. En este caso se empleó un *Model 785 Vacuum Blotter* (Bio-Rad). El proceso se llevó a cabo durante 90 minutos a 5 pulgadas de mercurio de vacío. Se puede confirmar la transferencia de ADN mediante tinción del gel con bromuro de etidio.
5. Sumergimos la membrana de nylon en una solución SSC 2x^A durante 5 minutos y secamos entre dos láminas de papel de filtro.
6. Por último, se somete a la membrana a un proceso de fijación por UV en el equipo Stratalinker 1800 (Stratagene).

3.16.2. Transferencia directa de ADN mediante sistema de vacío (*Dot blot*)

La transferencia directa de muestras de ADN a filtros de nylon se realizó de la siguiente forma:

1. La muestra de ADN se mezcló con 250 μL de una solución NaOH 0,4 M, EDTA 10 mM y se calentó durante 10 minutos a 100 $^{\circ}\text{C}$ para desnaturalizar la muestra.
2. Inmediatamente después, y para evitar que las hebras vuelvan a hibridar se añadieron 250 μL de acetato amónico 2 M pH 7 manteniendo la mezcla en hielo.

Una vez montada la membrana de nylon en el equipo Bio-Dot[®] SF Microfiltration (Bio-Rad) y humedecer los pocillos con agua, se trasvasaron las muestras a los pocillos seleccionados. Aplicando vacío, se añadieron 500 μL de NaOH 0,4 M en cada uno de los pocillos. Tras succionar esta solución, desmontamos el equipo, sumergimos la membrana de nylon en una solución SSC 2x^A durante 5 minutos y secamos entre dos láminas de papel de filtro. Por último, sometimos a la membrana a un proceso de fijación en el equipo UV Stratalinker 1800 (Stratagene).

3.17. Hibridación de ácidos nucleicos

3.17.1. Marcaje de las sondas

Empleamos como sondas amplicones de PCR purificados mediante electroforesis en geles de agarosa. El marcaje de fragmentos de ADN como sondas de hibridación, se realizó con el kit *DNA Dig-High Prime* (Roche). El ADN obtenido se desnaturalizó a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Inmediatamente después se enfrió en hielo, se añadieron 4 μL de reactivo *Dig-High Prime* (Roche) y se incubó la mezcla durante 14-16 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Por último, se añadió tampón TE^A hasta un volumen de 500 μL para detener la reacción de síntesis de ADN.

3.17.2. Prehibridación e hibridación

El proceso de hibridación comenzó con una incubación de los filtros con la solución *Dig Easy Hyb* (DIG Easy Hyb Granules, Roche) durante 30 minutos a 42 °C, en agitación constante. A continuación, se desnaturalizaron las sondas marcadas, sometiéndolas a 100 °C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo para posteriormente ser añadidas a una solución de *Dig Easy Hyb* fresca. Una vez retirada la solución de prehibridación, añadimos la mezcla conteniendo la sonda marcada y se incubó a 42 °C durante 14-16 horas. Tanto la prehibridación como la hibridación se llevaron a cabo en un horno de hibridación (Amersham, GE Healthcare Life Sciences).

3.17.3. Detección

El proceso de detección de las sondas comenzó por dos lavados de 5 minutos a 25 °C con SSC 2x^A y SDS al 0,1 % en agitación constante. A continuación, realizamos otros dos lavados, pero de 15 minutos a 65 °C con SSC 0,5x al 0,1 % SDS en agitación constante. Por último procedimos al revelado, mediante el siguiente protocolo:

1. Se incuba el filtro hibridado durante 30 minutos con 100 mL de solución de bloqueo^A.
2. Se incuba durante 30 minutos con 20 mL de la solución de anticuerpo^A.
3. Se realizan 2 lavados de 15 minutos con tampón de lavado^A.
4. Se equilibra durante 5 minutos con tampón de detección^A.
5. Se incuba con sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina (40 µL de NBT/BCIP por cada 2 mL de tampón de detección) en oscuridad y se para la reacción mediante lavados con agua.

3.18. Detección de peptidoglicano

La cuantificación de peptidoglicano en muestras bacterianas se realizó indirectamente cuantificando el ácido murámico. Las muestras bacterianas se lavaron extensivamente con NaCl 0,9 % y se resuspendieron en PBS^A. Se lisaron las células con esferas de vidrio en un homogeneizador FastPrep-24 (MP Biomedicals LCC, Francia) mediante 20 pulsos de 5 segundos a máxima velocidad. A continuación, las muestras recogidas mediante centrifugación, se incubaron en SDS 8% a 100 °C durante 30 minutos. A continuación, se realizaron lavados exhaustivos con agua destilada hasta eliminar el SDS. Por último, se resuspendieron las muestras lisadas en agua destilada, y se determinó la concentración de peptidoglicano empleando el método descrito por Hoijer (Hoijer et al., 1995), mediante el siguiente protocolo:

1. Se hidroliza el ácido murámico, liberándose ácido láctico, añadiendo al lisado celular el mismo volumen de H₂SO₄ 5 M. Se incuba durante 2 horas a 90 °C.
2. Se enfría a temperatura ambiente y se neutraliza añadiendo un volumen de NaOH 10 M por volumen de H₂SO₄. Se completa el volumen con agua hasta 750 µL.
3. Se recogen 100 µL (y 33 µL de sobrenadante tras la lisis celular de muestras no hidrolizadas, a las que se añade 67 µL de agua) y se añaden 50 µL de NaOH 1 M. Se incuba durante 30 minutos a 37 °C.
4. Se añade 1 mL de H₂SO₄ 18,8 M y se incuba 210 segundos a 100 °C. Inmediatamente después, se enfrían las muestras en hielo.
5. Se añaden 10 µL de CuSO₄·5H₂O 160 mM y 20 µL de 4-fenilfenol 90 mM (en etanol). Se mezcla e incuba durante 30 minutos a 37 °C.
6. Se mide absorbancia a 570 nm para determinar la concentración de ácido láctico.

En paralelo, se realiza una recta de calibrado con diluciones de ácido láctico (0-100 µg/mL) sometidas a los pasos 3-6 del procedimiento descrito anteriormente. La concentración de ácido murámico de cada una de las muestras se obtuvo interpolando la absorbancia obtenida en la recta de ácido láctico.

3.19. Detección de bacteriófagos

3.19.1. Aislamiento de bacteriófagos y extracción de ADN

El procedimiento que se llevó a cabo para aislar bacteriófagos fue una modificación del método para purificar el bacteriófago λ descrito por Yamamoto (Yamamoto et al., 1970) y se describe a continuación:

1. Se parte de 1 L de sobrenadante de cultivo bacteriano, se filtra con una membrana de tamaño de poro de 0,2 μm y se divide en dos alícuotas de 500 mL. Se conserva a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.
2. Se añade ADNasa I y ARNasa A^A a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incuba 60 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$.
3. Se añade NaCl sólido a una concentración final de 1 M. Se disuelve e incuba durante 1h en hielo, de esta forma se promueve la disociación de las partículas del bacteriófago de los restos celulares que aún estén presentes.
4. Se eliminan todos los restos celulares mediante centrifugación a 11.000 g durante 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ (Avanti™ J25 Centrifuge, Beckman Coulter).
5. Se recoge el sobrenadante y se añade polietilenglicol (PEG 8000) sólido a una concentración final del 10 % (p/v). Se disuelve e incuba en hielo durante al menos 1 hora.
6. Se recuperan las partículas del bacteriófago mediante centrifugación a 11.000 g durante 10 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se resuspende el pellet en 2 mL de tampón SM^A.
7. Se elimina el PEG y los restos celulares añadiendo un volumen de cloroformo. Tras agitar 30 segundos con vórtex, se centrifuga a 3.000 g durante 15 min a 4 $^{\circ}\text{C}$.
8. Se recupera la fase acuosa superior y se centrifuga a 25.000 rpm durante 2 h a 4 $^{\circ}\text{C}$ en un rotor SW28 (Optima™ L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter).

9. Se resuspende el pellet en 1-2 mL de SM^A y se incuba 12-18 horas a 4 °C en agitación suave e intermitente para asegurarse de que todas las partículas víricas se han resuspendido.

A continuación, se procede a extraer el ADN fágico siguiendo el protocolo que se especifica a continuación:

1. Se añade proteinasa K a una concentración final de 50 µg/mL y SDS^A a una concentración final de 0,5 % (p/v) y se mezcla invirtiendo varias veces el tubo. Se incuba durante 1h a 56 °C.
2. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade el mismo volumen de fenol equilibrado con Tris 50 mM pH 8, se pipetea hasta que la emulsión esté completamente mezclada y se centrifuga a 3.000 g durante 5 minutos.
3. Se recoge la fase acuosa superior, se mezcla 1:1 con una mezcla equilibrada fenol:cloroformo (1:1) y se centrifuga a 3.000 g durante 5 minutos.
4. Se recupera la fase acuosa superior y se añade igual volumen de cloroformo.
5. Se centrifuga a 3.000 g durante 5 minutos y se recupera la fase acuosa superior.
6. Se añade acetato sódico 3 M pH 7 a una concentración final de 0,3 M; se mezcla bien y se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto.
7. Se almacena la solución a -20 °C durante 30 minutos y se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos.
8. Por último, se lava una vez con etanol frío al 70 %, se recupera el ADN centrifugando a 12.000 g durante 5 min a 4 °C y se resuspende el pellet en 100 µL de tampón TE pH 7,6.

Como control positivo del método de extracción se empleó el fago lambda obtenido tras infectar, en medio líquido, la cepa *E. coli* LE392 con 10⁹ ufp mediante el procedimiento descrito en Sambrook (Sambrook et al., 1987).

3.19.2. Detección de placas de lisis

La detección de bacteriófagos activos procedentes de cultivo bacteriano de *L. reuteri* CECT 8605 y su cuantificación mediante recuento de ufp, se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento (Aua y Raya, 2001):

1. Se inoculó medio líquido MRS con una colonia de la cepa de *L. reuteri* seleccionada como hospedadora y se incubó durante 16-18 horas a 37 °C y anoxia.
2. Mezclamos 100 µL del cultivo bacteriano obtenido en el paso 1 con 100 µL de sobrenadantes de cultivo susceptibles de presentar bacteriófagos activos.
3. Añadimos CaCl₂ hasta una concentración final de 10 mM e incubamos a 37 °C durante 30-180 min.
4. Añadimos la mezcla anterior a 3 mL de MRS (agar 0,7 % y CaCl₂ 10 mM) fundido y mantenido a 45 °C.
5. Extendemos la mezcla del paso 4 sobre placas Petri con 15 mL de medio MRS (agar 1,5 % CaCl₂ 10 mM) e incubamos a 37 °C durante 14-18 h.

La presencia de fagos activos da lugar a placas de lisis sobre un tapiz de crecimiento bacteriano. De nuevo, como control positivo, infectamos en medio sólido la cepa *E. coli* LE392 con el fago lambda mediante el procedimiento descrito en Sambrook (Sambrook et al., 1987).

3.19.3. Inducción de fase lítica con mitomicina C

La mitomicina C es un mutágeno capaz de inducir el inicio del ciclo lítico en un microorganismo portador de virus en estado lisogénico. Por ello, se empleó en los ensayos de detección de bacteriófagos en cepas de *L. reuteri*. Las cepas bacterianas seleccionadas se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis durante 16-18 horas en medio MRS líquido complementado con CaCl₂ 10 mM. Posteriormente, se añadió

mitomicina C 0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich) y se incubó a 37 °C comprobando el crecimiento y/o lisis bacteriana midiendo densidad óptica a 600 nm durante 6-12 h.

3.20. Modelos de experimentación *in vivo*

Los ensayos *in vivo* con animales de experimentación se llevaron a cabo por el equipo de investigación del Dr. Julio Gálvez del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Los animales utilizados para el experimento de reducción de los niveles de colesterol plasmático fueron 60 ratas Wistar hembras de 200 g de peso. 10 animales fueron alimentados con dieta de mantenimiento Teklad 2014 (Harlan Laboratories) y el resto de animales con dieta de mantenimiento complementada con un 1 % (p/p) de colesterol para inducir hipercolesterolemia. Los animales tenían acceso a la comida y bebida *ad libitum*, y fueron pesados diariamente. Las muestras bacterianas se administraron en el agua de bebida con una dosis calculada de $2 \cdot 10^9$ bacterias por animal y día.

Se tomaron muestra de sangre venosa de la cola de los animales a intervalos de 7-10 días, determinando la concentración de colesterol total en plasma. El ensayo se prolongó hasta el momento en el que se obtuvo un efecto hipercolesterolémico provocado por la dieta, con diferencias significativas entre el grupo control de animales sanos y el grupo control con hipercolesterolemia inducida. En ese momento, se procedió al sacrificio de los animales y determinación de los siguientes parámetros plasmáticos: colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, fosfolípidos y glucosa, empleando un analizador químico automático BS 200 (Mindray).

3.21. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de ensayos realizados en las mismas condiciones (réplicas) representados en las figuras provienen de la media aritmética de los valores de dichas réplicas. La dispersión de los datos se muestra como el intervalo de confianza ($\alpha=0,05$), la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (SEM).

Como herramienta estadística se realizó un contraste de medias (distribución t-Student) de dos colas, asumiendo varianza desconocida y un valor estadísticamente significativo de $p < 0,05$.

Capítulo 4. Resultados y Análisis

El objetivo general del trabajo presentado en esta memoria fue encontrar muestras con actividad hipocolesterolemica, y para ello, se diseñó una serie de experimentos enfocados a estudiar tres posibles dianas en el proceso de absorción de colesterol.

La primera de estas dianas fue la enzima colesterol esterasa, seleccionada para analizar si alguna de las muestras poseía la capacidad de inhibir su actividad. Esta enzima participa en los primeros pasos del proceso de absorción de colesterol procedente de la dieta, hidrolizando los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos en el intestino delgado.

En el proceso de absorción de colesterol, las moléculas de este compuesto que se obtienen tras la actuación de la enzima colesterol esterasa, se solubilizan en micelas, compuestas por sales biliares y fosfolípidos, que permiten su transporte e interacción con la membrana de las células epiteliales del intestino (los enterocitos). Un déficit de sales biliares puede reducir la absorción de colesterol e indirectamente derivar el colesterol plasmático hacia la síntesis de sales biliares. Por ello, la segunda estrategia seleccionada fue comprobar si alguna de las muestras de la colección poseía la capacidad de hidrolizar sales biliares.

La última etapa del proceso de absorción intestinal de colesterol es el transporte al interior del enterocito. Para estudiar este proceso, y como tercer plan de trabajo, se puso a punto un ensayo *in vitro* para detectar el transporte de un análogo fluorescente del colesterol (fluoresterol) al interior de enterocitos cultivados y, de nuevo, se analizó la capacidad de inhibir este proceso que presentaban las muestras que componen nuestra muestroteca.

4.1. Ensayos de inhibición de la enzima colesterol esterasa

La colesterol esterasa, también denominada carboxil-éster hidrolasa (EC 3.1.1.13), es una enzima lipolítica que hidroliza enlaces éster. Como ya se comentó en “Materiales y Métodos” (ver apartado 3.7.1), la actividad de esta enzima se analizó midiendo la concentración del compuesto cromóforo 4-nitrofenol, liberado a partir del sustrato 4-nitrofenilbutirato (4-NPB) por la acción de dicha enzima y cuantificable mediante espectrometría a 415 nm.

Una vez establecidas las condiciones del ensayo para la búsqueda de muestras inhibitoras de actividad colesterol esterasa (ver apartado 3.7.1 de “Materiales y Métodos”), se comprobó la capacidad de las muestras que componen la colección, de reducir la velocidad de hidrólisis de 4-NPB 2,5 mM durante 10 minutos y en presencia de 0,01 U/mL de enzima colesterol esterasa. Un ejemplo de los resultados obtenidos se representa en la figura 4.1 con las muestras derivadas de la cepa *L. gasseri* BT 818.

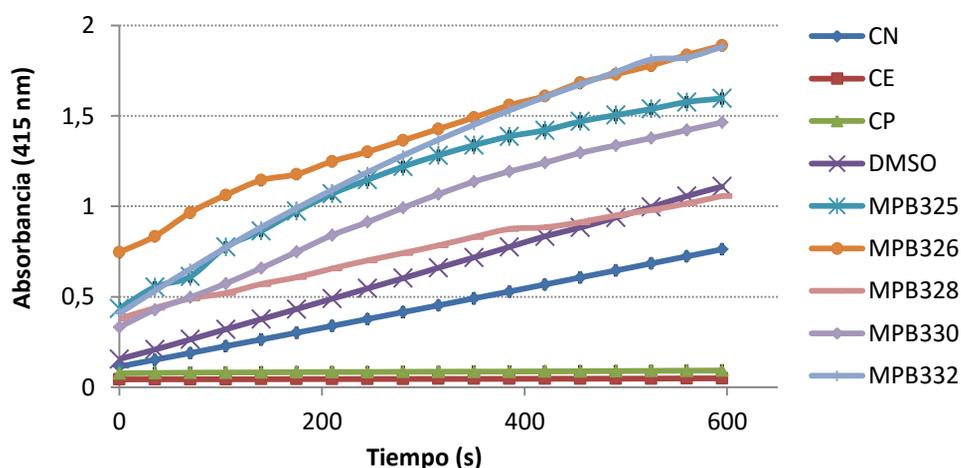


Figura 4.1. Hidrólisis de 4-NPB en presencia de la cepa *L. gasseri* BT 818 (MPB325, cepa viva; MPB326, tratamiento térmico; MPB328, tratamiento base; MPB330, tratamiento con peróxido de hidrógeno; MPB332, tratamiento con presión) y reacciones control (CN, sin muestra bacteriana; CE, sin enzima; CP, DEUP 0,4 mM; con DMSO).

Los datos de la cinética enzimática se emplearon para determinar la velocidad de reacción ($\Delta_{\text{Abs}}415 \text{ nm/s}$) en presencia de cada una de las muestras, y este valor se normalizó expresándolo en porcentaje, en función de la velocidad de reacción observada en los controles negativos realizados sin presencia de muestras bacterianas (Figura 4.2).

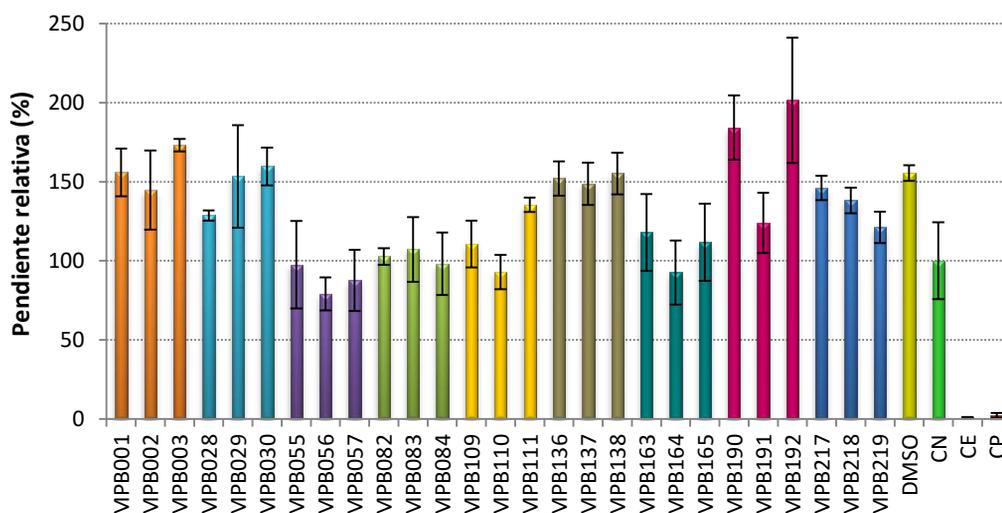


Figura 4.2. Actividad colesterol esterasa correspondiente a 3 cepas bacterianas (*L. coryniformis* CECT 5711, *L. fermentum* CECT 5716 y *L. gasseri* CECT 5714) procesadas mediante los distintos tratamientos de inactivación y los controles del ensayo (CN, sin muestra bacteriana; CE, sin enzima; CP, DEUP 0,4 mM; con DMSO).

No detectamos inhibición de la enzima colesterol esterasa, en nuestras condiciones de ensayo, por parte de ninguna de las muestras bacterianas. Algunas muestras indujeron cinéticas enzimáticas con una pendiente superior al control negativo. Este hecho puede deberse a que en estos casos, las muestras estén facilitando la interacción entre enzima y sustrato (incrementando la solubilidad del 4-NPB, por ejemplo), como parece suceder con el DMSO (utilizado como solvente del DEUP y ensayado como control, Figura 4.2).

4.2. Ensayos de actividad hidrolasa de sales biliares

El colesterol liberado por la enzima colesterol esterasa necesita ser solubilizado en el lumen intestinal y transportado hasta el enterocito para su absorción. En este proceso participan las sales biliares, formando micelas que actúan de vehículo de transporte de compuestos de naturaleza lipídica, como es el caso del colesterol.

Los ensayos para detectar actividad hidrolasa de sales biliares (actividad HSB) se llevaron a cabo únicamente con la fracción de la colección de muestras correspondiente a las bacterias vivas, debido a que probablemente, los procesos de inactivación desnaturarían y/o inactivarían la dotación enzimática de dichos microorganismos.

Tras el ensayo en el que se cuantificó la taurina liberada por la hidrólisis de sales biliares porcinas (ver apartado 3.7.2 de “Materiales y Métodos”), los resultados obtenidos revelaron que algunas cepas microbianas que forman parte de la colección, eran capaces de hidrolizar dichas sales biliares (Figura 4.3). Sin embargo, los niveles de actividad que mostraron fueron muy inferiores al grado de actividad que detectamos en la cepa de *L. plantarum*, aislada de un producto comercial, empleada como control positivo. Estos resultados, no todo lo positivos que esperábamos, hicieron que centráramos nuestros esfuerzos en buscar otras actividades biológicas en nuestra colección de muestras, que permitieran su empleo como ingredientes activos para combatir la hipercolesterolemia.

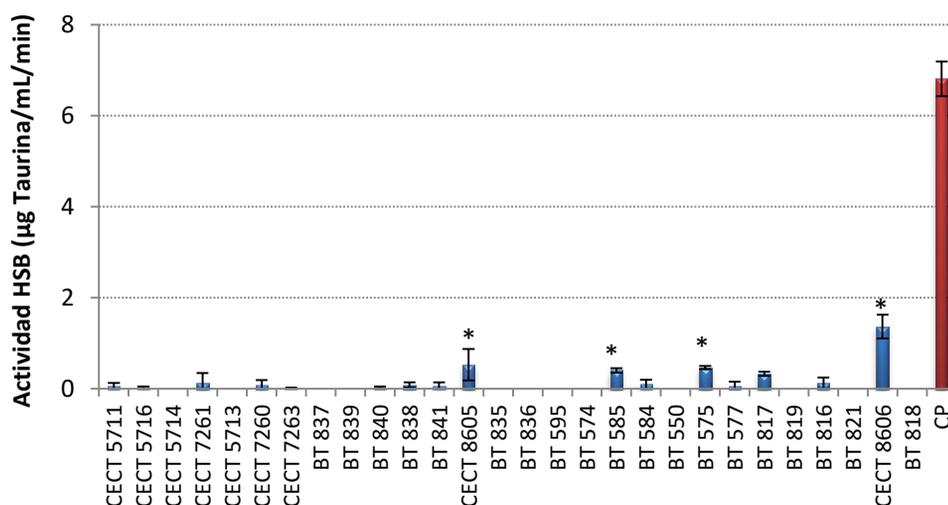


Figura 4.3. Actividad HSB de las 28 cepas vivas que forman parte de la colección de muestras y de la cepa comercial empleada como control positivo (CP). Se señala con asterisco (*) aquellas cepas con cierta actividad HSB.

4.3. Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de absorción de fluoresterol, que se mostrarán más adelante, se llevaron a cabo en cultivos *in vitro* de enterocitos. Un posible efecto tóxico por parte de las muestras de nuestra colección podría, por tanto, alterar los resultados obtenidos con nuestro método experimental. Por esta razón, se decidió analizar la citotoxicidad de las muestras que componen la colección (ver apartado 3.7.3 de “Materiales y Métodos”). Los ensayos se llevaron a cabo empleando 3 líneas celulares: macrófagos RAW 264.7, fibroblastos L929 y adipocitos 3T3-L1, debido a que permitieron simplificar el desarrollo de estos análisis, gracias a su rápido crecimiento, y debido a que estas líneas celulares se emplearon para detectar otras actividades biológicas, no tratadas en esta memoria. No obstante, los ensayos de toxicidad se repitieron también en cultivos de enterocitos diferenciados (tras 14 días de cultivo) con algunas muestras bacterianas cuando se consideró necesario.

Los valores de viabilidad celular, tras 24 horas de incubación con las muestras bacterianas ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL de células, 5 mg/mL de extractos y 10 % de sobrenadantes de cultivo) revelaron que dos muestras de la colección mostraban signos de citotoxicidad en las 3 líneas celulares empleadas para este ensayo. Dichas muestras corresponden a *L. reuteri* CECT 8605 tratado con base (MPB094) y a *L. casei* BT838 inactivado mediante microondas (MPB119; Figura 4.4).

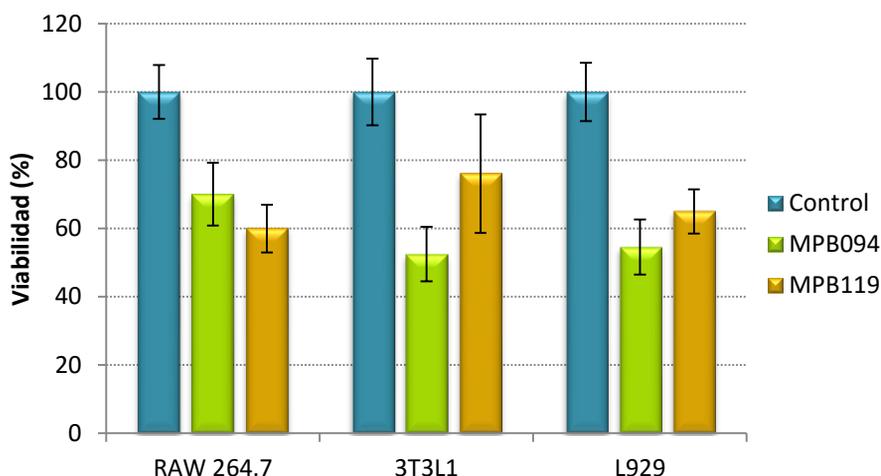


Figura 4.4. Efecto de las muestras MPB094 (*L. reuteri* CECT 8605 tratado con base) y MPB119 (*L. casei* BT 838 inactivado con microondas) sobre la viabilidad celular de 3 líneas celulares (RAW 264.7, 3T3-L1 y L929) en comparación con el control del ensayo (células sin muestra bacteriana).

Algunas de las muestras procedentes de las extracciones obtenidas con agua y etanol redujeron la viabilidad por debajo del 80 % (datos no mostrados). Sin embargo, puede que las condiciones osmóticas u otros factores distintos a la presencia de compuestos tóxicos sean los responsables de estos resultados. Cabe destacar, que los resultados obtenidos tras analizar la citotoxicidad de los sobrenadantes de las 3 cepas de *L. gasseri* que existen en la colección, sí revelaron un efecto tóxico de estas muestras sobre las 3 líneas celulares (Figura 4.5).

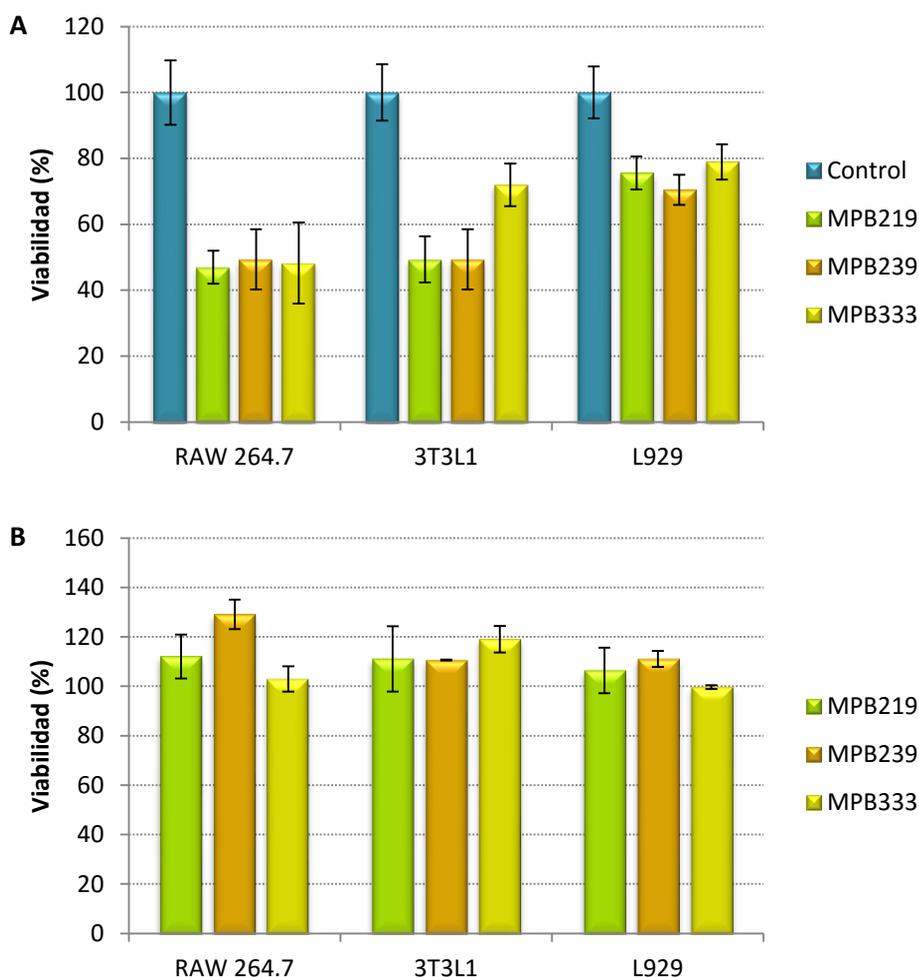


Figura 4.5. Efecto sobre la viabilidad en las líneas celulares: RAW 264.7, 3T3L1 y L929 de (A) los sobrenadantes de *L. gasseri* CECT 5714 (MPB219), *L. gasseri* BT 817 (MPB239) y *L. gasseri* BT 818 (MPB333) en comparación con el control (células sin muestra bacteriana) y de (B) el medio de crecimiento de cada una de las cepas de *L. gasseri* sin ser inoculado con la bacteria.

El análisis de la toxicidad celular de los medios de cultivo empleados para obtener las muestras mencionadas reveló que el efecto tóxico se debe a alteraciones provocadas por el crecimiento de los microorganismos (Figura 4.5). Algunas cepas de *Lactobacillus* exhiben actividad antibacteriana debido a la producción de ciertos metabolitos, entre los que se incluyen el peróxido de hidrógeno, ácido láctico o bacteriocinas (Atassi y Servin, 2010; Otero y Nader-Macías, 2006). Por tanto, la

producción de alguno de estos compuestos podría ser responsable del efecto tóxico detectado en nuestros ensayos en cultivos celulares. El análisis de la concentración de peróxido de hidrógeno en los sobrenadantes del cultivo de las tres cepas de *L. gasseri*, reveló una concentración inferior a 0,2 mM, concentración que no es suficiente para explicar la pérdida de viabilidad observada en nuestros ensayos (resultados no mostrados; Sañudo et al., 2016). Por consiguiente, otros metabolitos o la combinación de ellos, producidos por *L. gasseri*, en las condiciones de crecimiento empleadas, deben ser los responsables de la toxicidad detectada en nuestras muestras.

4.4. Ensayos de inhibición de absorción de fluoresterol en líneas celulares

La interacción del colesterol con el enterocito, y su posterior transporte al interior celular, es un paso crítico en el proceso de absorción de colesterol. Por ello, se estudió si las muestras de nuestra colección eran capaces de alterar este proceso, en un sistema *in vitro*, empleando una molécula testigo fácilmente detectable (fluoresterol) y cultivos de líneas celulares para tratar de reproducir las características y funcionalidades del epitelio intestinal *in vivo*.

4.4.1. Puesta a punto del ensayo *in vitro* para estudiar la absorción de fluoresterol

Los diferentes ensayos en los que se ha estudiado la absorción de colesterol *in vitro*, empleando líneas celulares inmortalizadas, han demostrado reproducir características y funcionalidades muy similares a las observadas en el epitelio intestinal *in vivo*. Por este motivo, se consideran un modelo aceptable para estudiar el metabolismo del colesterol, mediante marcaje con isótopos radioactivos o análogos fluorescentes de esta molécula. Los ensayos realizados empleando fluoresterol (*NBD-cholesterol*) han arrojado los mejores resultados en cuanto a intensidad de fluorescencia incorporada en enterocitos en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Sparrow et al., 1999). Por ello,

se decidió llevar a cabo los experimentos de absorción de colesterol empleando esta molécula como testigo, incluida en micelas de fosfatidilcolina y taurocolato sódico (Kheirloomoom y Ferrara, 2007), para simular, en la mayor medida posible, las condiciones fisiológicas.

El procedimiento de elaboración de micelas de fluoresterol, así como la cuantificación de la internalización de dicho compuesto se describe en el apartado 3.7.4 de “Materiales y Métodos”, y es la metodología empleada para todos los ensayos de absorción de fluoresterol en cultivos celulares que se presentan en esta memoria.

4.4.1.1. Selección de la línea celular

Hay distintas líneas celulares de enterocitos que permiten simular *in vitro* distintos procesos biológicos que se desarrollan en el epitelio intestinal, tres de las cuales se encontraban disponibles en nuestro laboratorio: Caco-2, HT-29 y DIEC. Antes de abordar los experimentos de inhibición de absorción de fluoresterol, comprobamos cuál de ellas era la más adecuada. Para ello, se comparó la fluorescencia celular interna, determinada mediante citometría, en cada una de las líneas celulares tras una incubación de 2 horas a 37 °C con fluoresterol (5 µg/mL) incorporado en micelas. Los resultados se presentan en la figura 4.6, donde la fluorescencia media por célula puede interpretarse como la cantidad de fluoresterol absorbido.

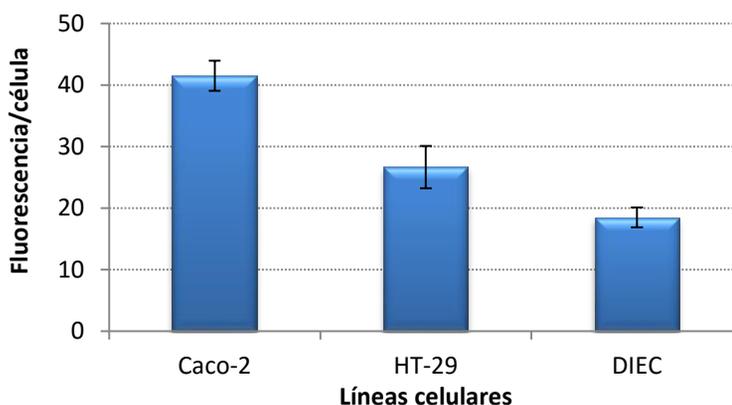


Figura 4.6. Intensidad de fluorescencia celular interna, expresada en unidades arbitrarias, tras incubar las líneas celulares Caco-2, HT-29 y DIEC con fluoresterol (5 µg/mL) en micelas.

Además de por citometría, la capacidad de las líneas celulares empleadas para incorporar fluoresterol pudo ser observada mediante microscopía de fluorescencia, tras 90 minutos de incubación con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fluoresterol (Figura 4.7).

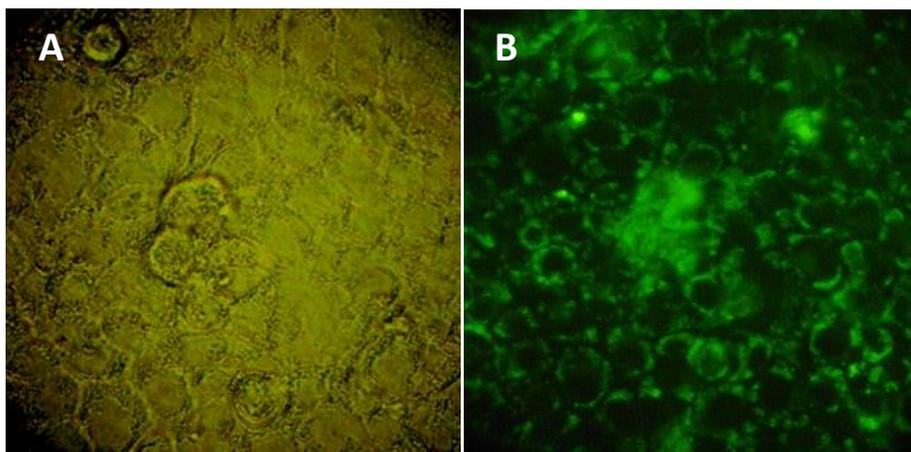


Figura 4.7. Células HT-29 fotografiadas mediante microscopía (400x) visible (A) y de fluorescencia (B; Ex450 – 490 nm) tras ser incubadas en presencia de fluoresterol.

Estos ensayos demostraron que las tres líneas celulares empleadas (Caco-2, HT-29 y DIEC) son capaces de absorber fluoresterol (Figura 4.6). Descartamos para posteriores ensayos la línea celular DIEC, de origen canino, debido a que uno de los objetivos de esta tesis es encontrar alguna muestra con capacidad hipocolesterolémica con vistas a una posible aplicación en alimentación humana. Además, en el momento de comenzar los ensayos de absorción de fluoresterol por enterocitos, la línea celular Caco-2 mostró cierta inestabilidad (falta de adherencia, cultivos no homogéneos...) que no pudo solventarse controlando estrictamente las condiciones de cultivo ni substituyendo el stock de inicio del cultivo. Estos hechos se reflejaron además en datos de absorción de fluoresterol poco repetitivos, que nos llevaron a descartar también esta línea celular.

La línea celular HT-29, de origen humano, forma monocapas polarizadas de células diferenciadas con una elevada homología con el epitelio intestinal (Pinto et al., 1983) cuando se cultiva en ausencia de glucosa y presencia de galactosa (Rousset, 1986). Como primer paso, en la puesta a punto de la metodología experimental, decidimos

comprobar si las condiciones de cultivo (empleando medio estándar de cultivo o medio que facilita la diferenciación, ver tabla 3.13) afectaban significativamente a la absorción de fluoresterol por parte de los enterocitos HT-29. Para ello, se cultivó la línea celular HT-29 en medio estándar (medio A), en medio con baja concentración en glucosa (medio B) y en medio con baja concentración en glucosa suplementado con galactosa (medio C). Tras un periodo de 15 días, se incubaron dichos cultivos con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se cuantificó la fluorescencia celular interna tras 2 horas de incubación. Los resultados de este ensayo (Figura 4.8), no revelaron diferencias drásticas entre la fluorescencia interna de células cultivadas en presencia (medio C) o ausencia de galactosa (medio B). Sí observamos una menor absorción de fluoresterol en presencia de una mayor concentración de glucosa (medio A), aunque exhibiendo valores adecuados para llevar a cabo ensayos de inhibición de absorción, por lo que optamos por cultivar los enterocitos HT-29 en medio estándar, con objeto de simplificar la metodología.

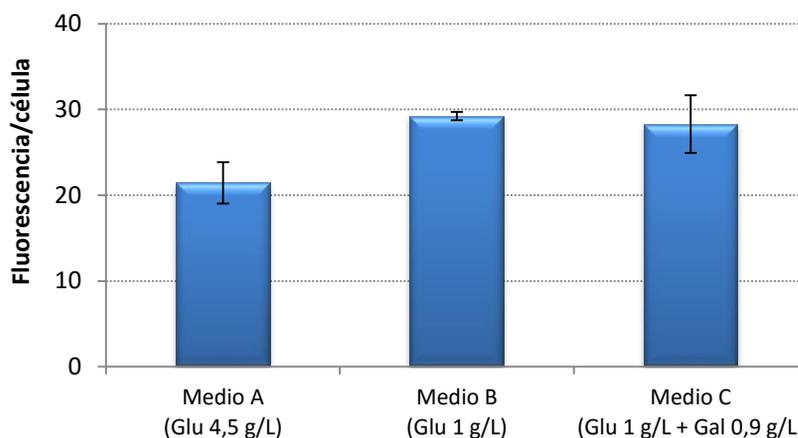


Figura 4.8. Intensidad de fluorescencia celular interna de células HT-29, expresada en unidades arbitrarias, tras ser cultivadas en los medios que se indican durante 15 días y una posterior incubación con micelas de fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). NOTA: Glu = glucosa y Gal= galactosa.

4.4.1.2. Efecto de la concentración de fluoresterol, micelas y el tiempo de incubación sobre la absorción de fluoresterol.

La concentración de fluoresterol y su distribución en las micelas son parámetros que definimos antes de realizar los ensayos de inhibición de absorción de esta molécula. En primer lugar, se ensayaron diferentes concentraciones de fluoresterol, manteniendo la misma estequiometría de microgramos de fluoresterol por miligramo de micela.

La fluorescencia por célula, evaluada por citometría, tras 2 horas de incubación (Figura 4.9) mostró una relación directamente proporcional con la concentración de fluoresterol ensayada, perdiéndose la linealidad a partir de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fluoresterol (Figura 4.9.B), por lo que decidimos establecer esta concentración como la estándar en nuestra metodología de trabajo.

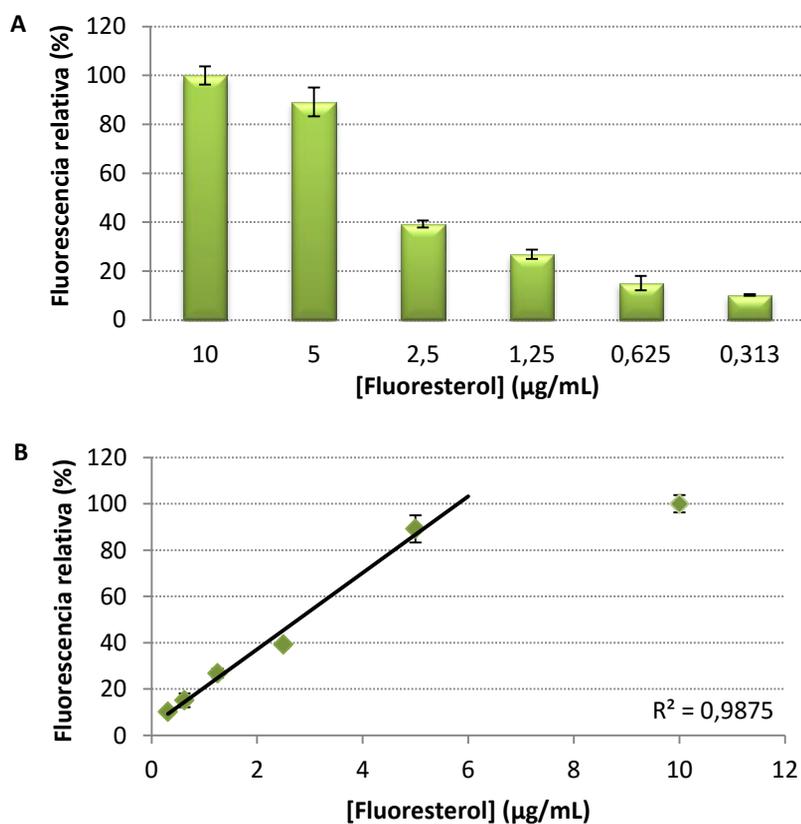


Figura 4.9. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras una incubación de 2 horas a 37 °C con distintas concentraciones de micelas de fluoresterol.

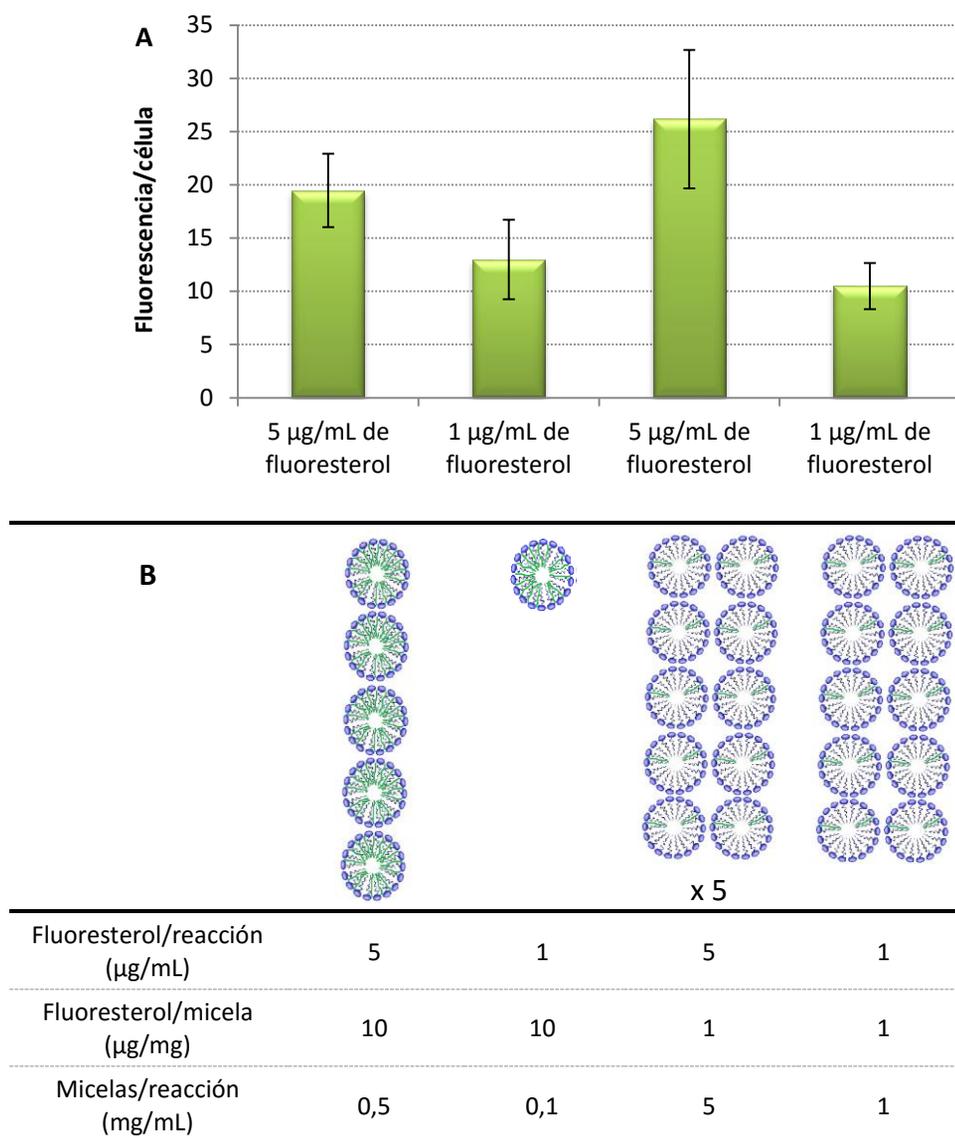


Figura 4.10. Efecto de la concentración de fluoresterol y su concentración relativa en las micelas de fosfatidilcolina sobre su absorción por enterocitos HT-29. (A) Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras una incubación de 2 horas con distintas concentraciones de micelas y de fluoresterol. (B) Representación gráfica de cada condición, en la cual se simula el fluoresterol, en color verde, y la cantidad de micelas que se añaden en cada una de condiciones.

Además de la concentración absoluta de fluoresterol, su concentración relativa en las micelas podría afectar a su transporte hasta las células intestinales. Esta hipótesis se analizó empleando 2 concentraciones de fluoresterol (5 y 1 µg/mL) solubilizado en 4

concentraciones de micelas (5; 1; 0,5 y 0,1 mg/mL). De nuevo, después de incubar 2 h las distintas suspensiones de fluoresterol con cultivos de enterocitos HT-29 y analizar la fluorescencia por célula mediante citometría, se observó que la concentración absoluta de fluoresterol era el parámetro que determinaba la fluorescencia por célula, más que la concentración relativa de esta molécula en las micelas de fosfatidilcolina (Figura 4.10). Decidimos seleccionar 0,5 mg/mL de micelas en las reacciones de absorción, con una concentración de fluoresterol de 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$, de nuevo para simplificar las condiciones de ensayo.

Por último, para estudiar cómo afectaba el tiempo de incubación al proceso de absorción de fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por los enterocitos HT-29, se ensayaron diferentes tiempos: 60, 120 y 180 min. Finalizada la incubación, la fluorescencia media por célula se cuantificó mediante fluorocitometría (Figura 4.11), observándose que la fluorescencia de las células HT-29, asociada a la absorción de fluoresterol, se incrementaba al prolongar el tiempo de incubación, al menos hasta los 180 minutos.

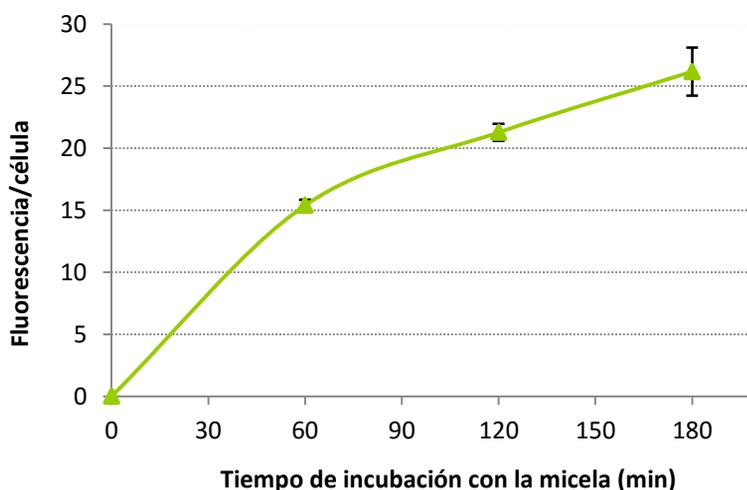


Figura 4.11. Intensidad de fluorescencia de enterocitos HT-29, expresada en unidades arbitrarias, tras ser incubadas con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en micelas durante diferentes tiempos.

Los datos obtenidos nos permitieron definir 2-3 horas de incubación como tiempo suficiente para poder detectar absorción del análogo fluorescente del colesterol.

4.4.1.3. Búsqueda de un inhibidor de la absorción de fluoresterol

Una vez establecidas las condiciones óptimas de ensayo para detectar la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos HT-29, nos planteamos validar nuestro modelo *in vitro* para la búsqueda de inhibidores de la absorción de colesterol. Para ello, se analizó el efecto de varios compuestos con actividad hipocolesterolémica reconocida.

Efecto de ezetimiba sobre la absorción de fluoresterol

La ezetimiba actúa como un potente reductor de la absorción intestinal de colesterol a través del bloqueo de la proteína transportadora de membrana NPC1L1, que participa en la internalización del colesterol al interior del enterocito, razón por la cual se seleccionó este compuesto como posible control positivo en nuestros experimentos.

Se llevó a cabo un experimento en enterocitos en el que se analizó el efecto de ezetimiba 150 μM , solubilizado en etanol o en micelas de fosfatidilcolina, en dos condiciones: co-administrado con el fluoresterol (2 h de incubación) o tras una preincubación de 24 h y co-incubación con el fluoresterol. Los datos de fluorescencia por célula demostraron una reducción en la absorción de fluoresterol en las 4 condiciones ensayadas (Figura 4.12). Sin embargo, la preincubación durante 24 horas con ezetimiba disuelto en etanol, indujo el mayor grado de inhibición (superior al 30 %).

La concentración inicial de ezetimiba ensayada (150 μM) se seleccionó en base a datos bibliográficos. Para tratar de optimizar las condiciones de inhibición, se probaron varias concentraciones de ezetimiba, disuelto en etanol y con 24 horas de incubación. Además de la fluorescencia por célula de enterocitos HT-29, determinada mediante citometría, se cuantificó la toxicidad celular de cada una de las concentraciones de ezetimiba testadas (Figura 4.13). Los resultados revelaron que 150 μM de ezetimiba era la concentración que inducía una mayor inhibición de la absorción de fluoresterol, sin ejercer un efecto tóxico sobre los cultivos celulares.

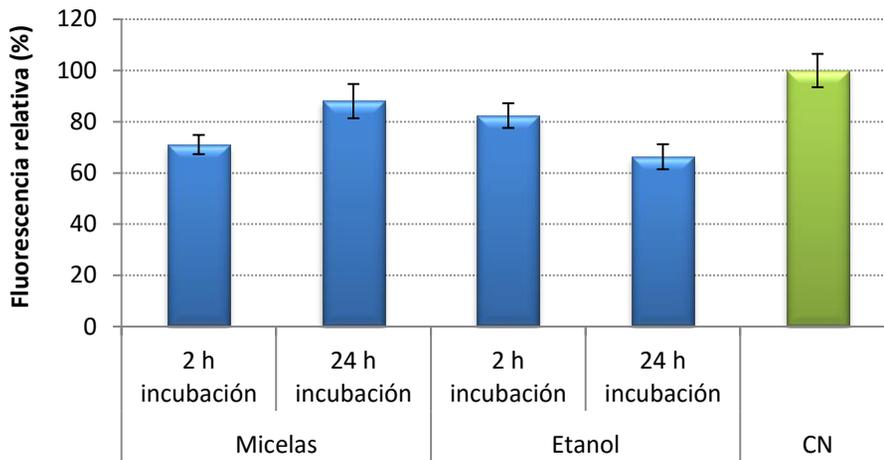


Figura 4.12. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras una preincubación con 150 μM de ezetimiba, en las condiciones de administración y tiempo indicados, y una posterior incubación con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fluoresterol. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra.

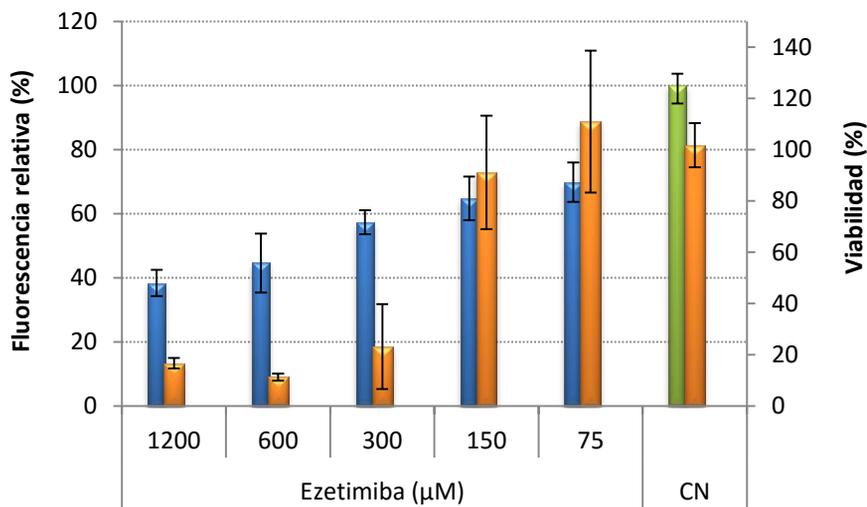


Figura 4.13. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras ser incubadas con ezetimiba (75-1.200 μM) y fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En naranja se muestra la viabilidad celular de las células HT-29. CN: control negativo de células HT-29 sin ezetimiba.

Efecto del galato de epigalocatequina sobre la absorción de fluoresterol

Además de detectar inhibición de la absorción de fluoresterol por interacción con los enterocitos, se quiso comprobar si nuestra metodología permitía detectar inhibidores que actuasen en otras fases del proceso de absorción del colesterol. Los ésteres galato de catequinas, como el EGCG (*Epigallocatechin gallate*, galato de epigalocatequina), reducen la solubilidad micelar del colesterol por perturbación de la estructura de los liposomas, produciendo un incremento en el tamaño de las micelas (Poklar Ulrich et al., 2010). Esta modificación en el tamaño de las micelas hace que se reduzca la afinidad del colesterol por ellas, reduciendo su disponibilidad para ser absorbido por el enterocito (Raederstorff et al., 2003).

La posible actividad inhibitoria del EGCG se analizó en ensayos en los que se preincubaron células HT-29 durante 1 hora con varias concentraciones de EGCG (0,5; 1 y 2 mM), posteriormente se añadieron las micelas de fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sin eliminar el EGCG, y se prosiguió con la incubación durante 2 y 3 horas más. Los datos de fluorescencia por célula no revelaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la absorción de fluoresterol entre las células preincubadas con EGCG y las células control (Figura 4.14), por lo que asumimos que nuestro modelo experimental no sería capaz de detectar compuestos que alteran la solubilidad micelar del fluoresterol, por un mecanismo similar al EGCG.

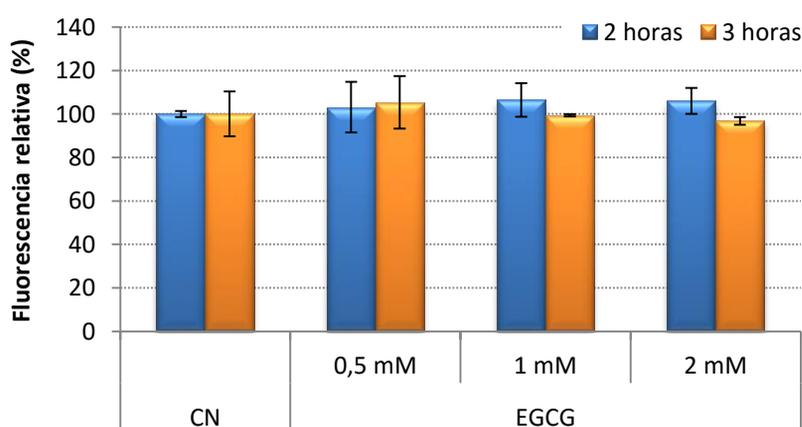


Figura 4.14. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras una preincubación de 1 hora con distintas concentraciones de EGCG y una incubación de 2 y 3 horas con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). CN: control negativo de células HT-29 sin EGCG.

Efecto del β -sitosterol sobre la absorción de fluoresterol

Existe abundante información en la que se cita el efecto inhibitorio sobre la absorción del colesterol que posee el β -sitosterol (Brauner et al., 2012; Field et al., 1997). El β -sitosterol se caracteriza por ser estructuralmente similar al colesterol y, aunque su absorción intestinal es menos eficiente, interfiere en la solubilización del colesterol en las micelas.

La actividad del β -sitosterol en nuestro modelo de absorción de colesterol se evaluó con concentraciones equimolares de β -sitosterol y fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El β -sitosterol se administró incorporado en las micelas de fluoresterol previamente al ensayo de absorción (condición A) o en forma de micelas preparadas de igual forma que las micelas de fluoresterol, pero sustituyendo este compuesto por β -sitosterol (condición B). Tras 2 horas de incubación con cultivos de enterocitos HT-29 se midió la fluorescencia interna de las células mediante citometría de flujo. Al contrario que en el caso del EGCG, la disminución de intensidad de fluorescencia por célula fue significativa (Figura 4.15), pero sólo en el caso en el que el β -sitosterol se encontraba solubilizado en las mismas micelas que el fluoresterol. La presencia de dos poblaciones diferentes de micelas, una conteniendo fluoresterol y la otra β -sitosterol, no provocó una disminución significativa de la absorción de fluoresterol.

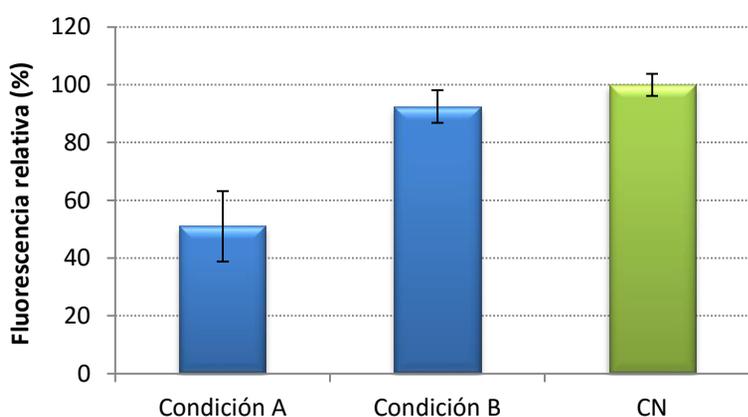


Figura 4.15. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras una incubación de 2 horas con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y β -sitosterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 2 condiciones de administración. CN: control negativo de células HT-29 sin β -sitosterol.

Efecto de hidrolasas de sales biliares

Aunque ya se comprobó que ninguna de las muestras de la colección posee actividad hidrolasa de sales biliares en un grado significativo, al menos en nuestras condiciones de ensayo (ver apartado 4.2; Figura 4.3), se realizó una prueba para analizar si el método diseñado para cuantificar inhibición de absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 también permitiría detectar una inhibición provocada por la hidrólisis de las sales biliares presentes en las micelas de fluoresterol.

Para ello, se incubaron las células HT-29 durante 24 horas con 3 concentraciones ($2 \cdot 10^8$, $5 \cdot 10^8$ y 10^9 ufc/mL) del probiótico comercial *L. plantarum* empleado en el apartado 4.2 como control positivo del ensayo. Posteriormente se añadió fluoresterol (5 $\mu\text{g/mL}$) y tras 2 horas de incubación se cuantificó la fluorescencia celular interna de los enterocitos. Los resultados revelaron que nuestro método de ensayo también detectaba el efecto de inhibidores de colesterol que actúan en fases previas a la interacción del fluoresterol con el enterocito, puesto que se observó un descenso significativo en la absorción de fluoresterol en presencia de la cepa *L. plantarum* con actividad hidrolasa de sales biliares (Figura 4.16). Además, el efecto inhibitorio reflejó una relación proporcional dosis-respuesta, con valores de inhibición desde el 50 % ($2,5 \cdot 10^8$ ufc/mL) hasta un 75 % (10^9 ufc/mL).

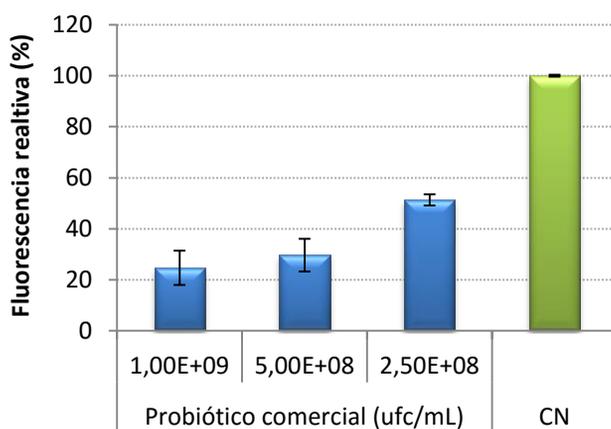


Figura 4.16. Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29, tras 24 horas de incubación con la cepa comercial *L. plantarum* con actividad HSB. CN: control negativo de células HT-29 sin probiótico.

El análisis del efecto de distintos productos con actividad hipocolesterolémica en nuestro modelo *in vitro*, nos ha permitido detectar inhibición de absorción de fluoresterol por varios mecanismos: interacción con transportadores (ezetimiba), competencia en el proceso de solubilización (β -sitosterol) e hidrólisis de sales biliares. Por ello, consideramos las condiciones experimentales adecuadas para comenzar la búsqueda de inhibidores de la absorción de colesterol en nuestra colección de muestras. Además, estos ensayos previos nos permitieron seleccionar la ezetimiba como control positivo para ser incluido en todos los ensayos posteriores.

4.5. Análisis de la capacidad de reducir la absorción de fluoresterol por las muestras de la colección

Una vez definido, puesto a punto y validado el método de ensayo, comprobamos la capacidad de reducir la absorción de fluoresterol por células HT-29 de las 336 muestras que componen nuestra muestroteca. Para ello, se incubaron las muestras durante 24 horas con las células HT-29, a una concentración de $5 \cdot 10^8$ ufc/mL en el caso de las muestras formadas por células bacterianas, 5 mg/mL en el caso de los extractos celulares y del 10 % (v/v) en el caso de los sobrenadantes. Tras el periodo de interacción entre las muestras y los cultivos celulares se añadieron las micelas de fluoresterol (5 μ g/mL) y se prolongó la incubación 2 horas más, tras lo cual, se cuantificó la internalización de fluoresterol mediante citometría. El criterio para considerar una muestra como positiva fue que redujera la fluorescencia celular interna en más de un 30 %, ya que consideramos que este grado de reducción podría ser suficiente para sustentar un efecto fisiológico *in vivo*. Además, esta reducción debería ser estadísticamente significativa (t-Student $p < 0,05$).

El análisis por triplicado, y el posterior estudio de los datos, identificaron 9 muestras de la colección que cumplieron el criterio descrito previamente (Tabla 4.1). Estas muestras procedían de 5 cepas de *Lactobacillus* y una cepa de *Bifidobacterium*, vivas y/o procesadas mediante distintos procedimientos: *L. casei* BT 838 (Figura 4.17.A), *L. reuteri* CECT 8605 (Figura 4.17.B), *L. plantarum* BT 595 (Figura 4.17.C), *B. breve* CECT

8606 (Figura 4.17.D), *L. fermentum* BT 584 (Figura 4.17.E) y *L. casei* BT 835 (Figura 4.17.F).

Tabla 4.1. Muestras con capacidad de reducir la absorción de fluoresterol en cultivos celulares HT-29.

Cepa	Tratamiento	Código	Fluoresterol intracelular (%)*
<i>Lactobacillus casei</i> BT 838	Control viva	-	65,359
	Control viva	-	63,096
<i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 8605	Térmico	MPB040	40,405
	Ácido	MPB067	52,772
	Microondas	MPB121	44,569
<i>Lactobacillus plantarum</i> BT 595	Control viva	-	66,437
<i>Bifidobacterium breve</i> CECT 8606	Térmico	MPB054	67,387
<i>Lactobacillus fermentum</i> BT 584	Térmico	MPB046	64,539
<i>Lactobacillus casei</i> BT 835	Base	MPB095	55,928

*Concentración intracelular relativa (%) a la concentración establecida mediante fluorocitometría en los controles negativos (sin incubación con muestras).

La actividad inhibitoria de las muestras indicadas fue comprobada en una nueva tanda de ensayos, en los que de nuevo, cada muestra fue ensayada por triplicado (resultados no mostrados). Además, y aunque ya se había analizado la citotoxicidad de cada muestra en distintas líneas celulares, se llevó a cabo un nuevo ensayo de citotoxicidad empleando la línea celular HT-29 y las muestras positivas seleccionadas en la búsqueda de actividad hipocolesterolémica (Tabla 4.1). Los resultados de este experimento nos permitieron descartar que el efecto inhibitorio observado fuera un artefacto provocado por toxicidad o capacidad de inducir daño celular asociado (resultados no mostrados).

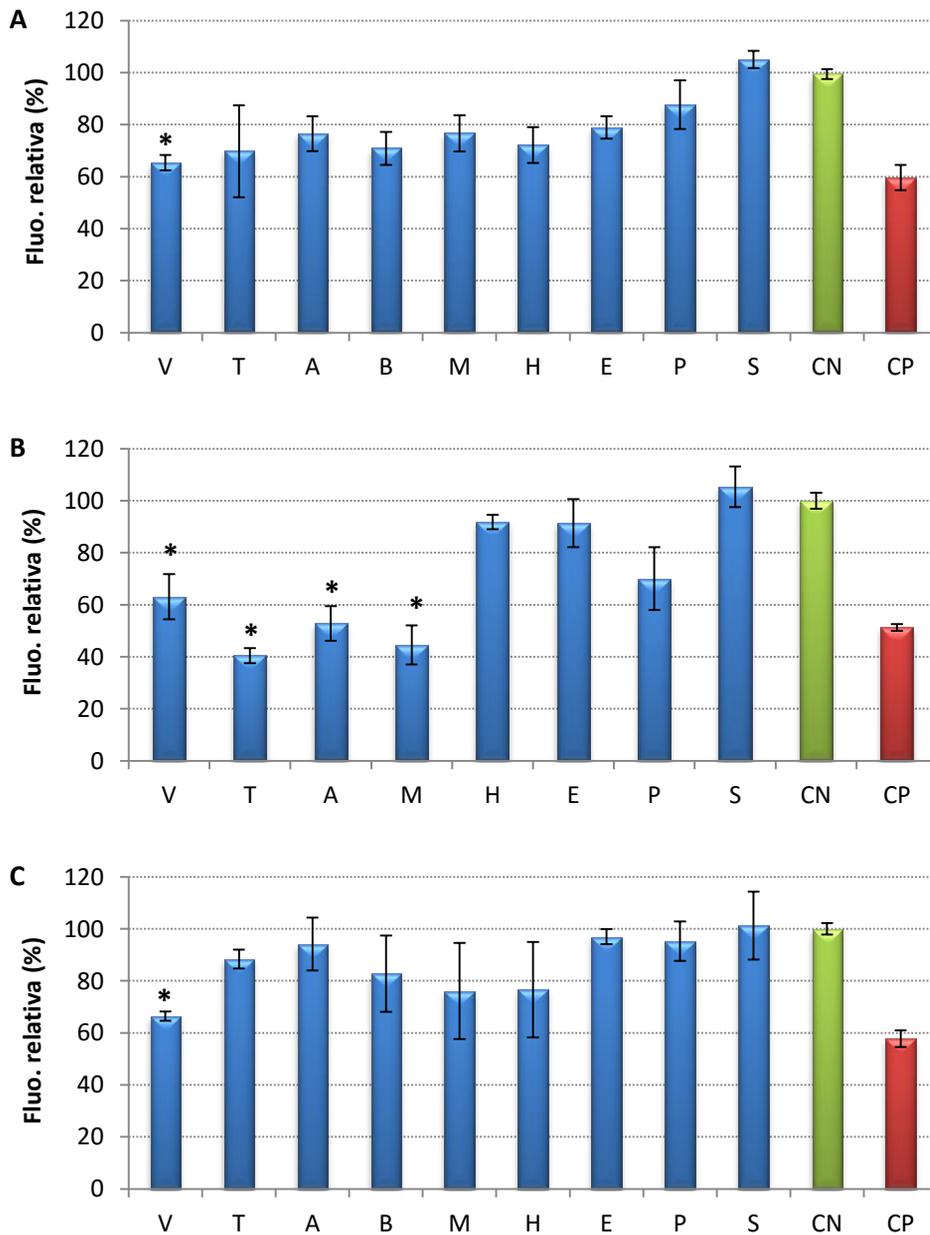


Figura 4.17. Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras la incubación con muestras de la colección ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) y fluoresterol ($5 \mu\text{g/mL}$). (A) *L. casei* BT 838; (B) *L. reuteri* CECT 8605; (C) *L. plantarum* BT 595; V, control vivo; T, inactivación térmica; A, inactivación con ácido; B, inactivación con base; M, inactivación con microondas; H, inactivación con peróxido de hidrógeno; E, inactivación con etanol; P, inactivación por presión; S, sobrenadante. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba. El asterisco indica un descenso en la absorción de fluoresterol del 30 % significativo estadísticamente ($p < 0,05$).

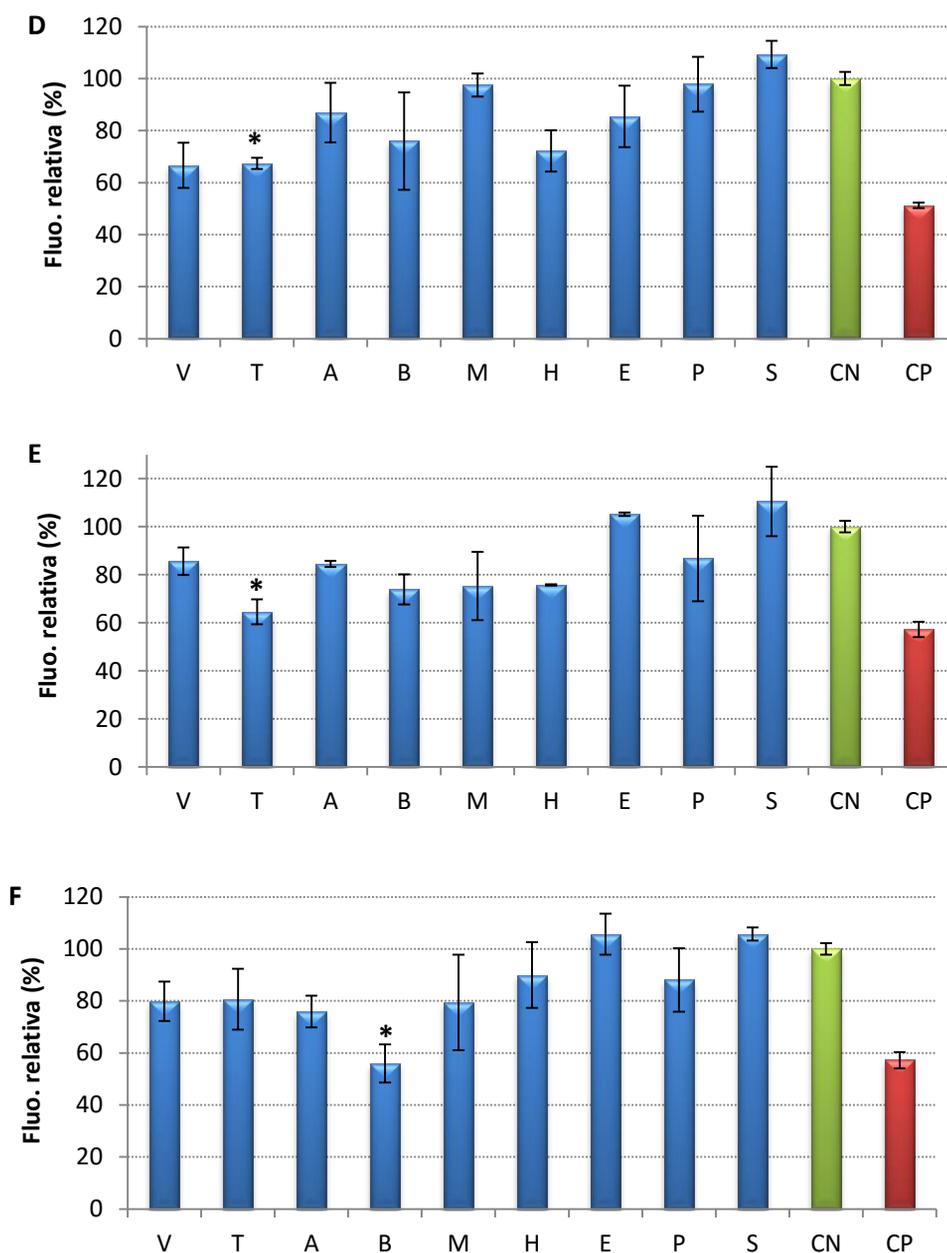


Figura 4.17 (Cont.). Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras la incubación con muestras de la colección ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) y fluoresterol ($5 \mu\text{g/mL}$). (D) *B. breve* CECT 8606; (E) *L. fermentum* BT 584 y (F) *L. casei* BT 835. V, control vivo; T, inactivación térmica; A, inactivación con ácido; B, inactivación con base; M, inactivación con microondas; H, inactivación con peróxido de hidrógeno; E, inactivación con etanol; P, inactivación por presión; S, sobrenadante. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba. El asterisco indica un descenso en la absorción de fluoresterol del 30 % significativo estadísticamente ($p < 0,05$).

Solo una de las cepas probióticas seleccionadas, *L. reuteri* CECT 8605, demostró capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol tras ser objeto de varios procesos de inactivación: sin tratar (viva), térmico, ácido y microondas (Figura 4.17.B). El resto de muestras positivas mostraron actividad únicamente en una condición: *L. casei* BT 838 y *L. plantarum* BT 595 vivos, *L. fermentum* BT 584 y *B. breve* CECT 8606 inactivados térmicamente y, por último, *L. casei* BT835 tratado con base (Tabla 4.1, Figura 4.17).

Los resultados obtenidos con las muestras de extractos celulares sobre la absorción de fluoresterol en la línea celular HT-29 arrojaron datos inesperados. Como puede verse en la figura 4.18, cerca del 50 % de estas muestras provocó una reducción significativa de la absorción de fluoresterol. Estos resultados pueden ser debidos a un efecto inespecífico (metabolitos comunes a la mayor parte de las cepas analizadas) o algún artefacto en nuestra metodología. En cualquier caso, la necesidad de destinar recursos a otros aspectos de la línea de trabajo presentada en esta memoria, ha hecho que hasta la fecha no hayamos podido analizar en profundidad este fenómeno.

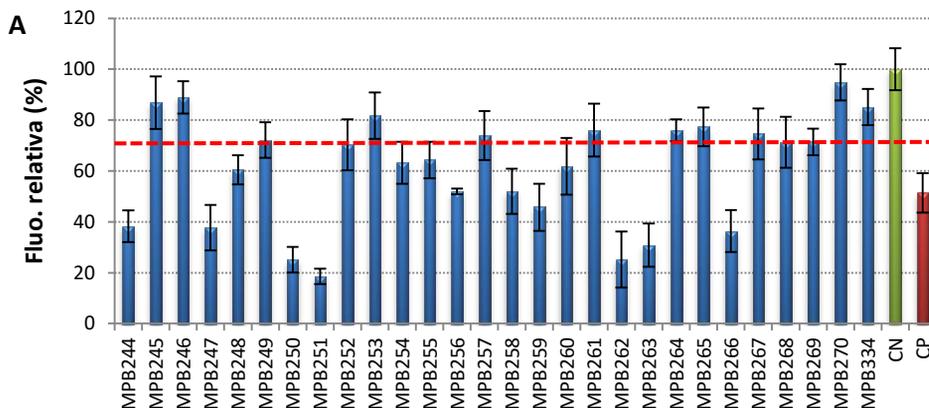


Figura 4.18. Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras una incubación con la fracción de extractos de la colección de muestras (5 mg/mL) y fluoresterol (5 µg/mL) en micelas. (A) Extracción con agua. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba.

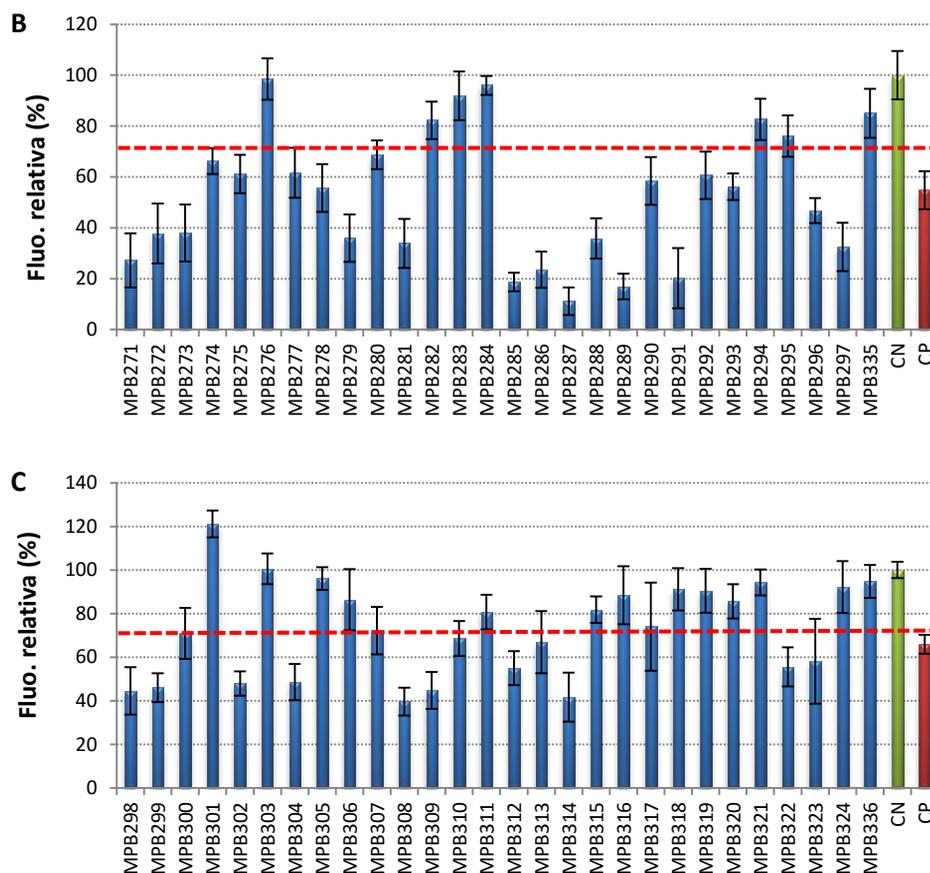


Figura 4.18 (Cont.). Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras una incubación con la fracción de extractos de la colección de muestras (5 mg/mL) y fluoresterol (5 μ g/mL) en micelas. (B) extracción con etanol; (C) extracción con acetona. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba.

4.6. Búsqueda del mecanismo de acción

Los resultados presentados hasta ahora nos permitieron identificar 6 cepas bacterianas con capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol en nuestro modelo *in vitro* con enterocitos HT-29. El fin último de nuestro trabajo de investigación era identificar cepas probióticas con actividad hipocolesterolémica *in vivo*. Por tanto, conocer el mecanismo de acción mediante el cual las cepas bacterianas identificadas

ejercen su efecto, permitiría abordar los estudios *in vivo* con más información sobre la probabilidad de éxito de dichos ensayos, además de facilitar el diseño de los mismos.

Sin embargo, en este punto de nuestro proyecto de investigación consideramos poco factible tratar de averiguar cuál era el mecanismo de acción de cada una de las 6 cepas seleccionadas (Tabla 4.1). Por este motivo, nos vimos obligados a elegir 2 de las mencionadas cepas para los ensayos subsiguientes. *L. reuteri* CECT 8605 fue una de las cepas seleccionadas debido a que ejerció la mayor reducción en la absorción de fluoresterol y, además, presentaba actividad viva y en tres tratamientos de inactivación diferentes (Figura 4.17.B). Seleccionamos también la cepa *B. breve* CECT 8606, microorganismo que redujo la absorción de fluoresterol tras un tratamiento térmico (Figura 4.17.D), debido a que tiene procedencia humana, lo que le confiere valor añadido desde el punto de vista comercial.

Los resultados que presentaremos a continuación, procedentes de ensayos destinados a determinar el mecanismo por el cual, *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 reducen la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos, han empleado en la mayoría de los casos células vivas o inactivadas térmicamente. *L. reuteri* CECT 8605 exhibe actividad tanto vivo como inactivado, como hemos visto previamente (Figura 4.17.B, Tabla 4.1). *B. breve* CECT 8606, sin embargo, solo cumplió los criterios de selección (reducir más del 30 % y significativo estadísticamente $p < 0,05$) tras ser inactivado térmicamente. El grado de inhibición que inducen las células vivas de este microorganismo es, en la mayoría de los casos, superior al 30 %, aunque con una variabilidad que no permite atribuir significancia estadística a esta reducción en todos los ensayos. Aun así, creemos conveniente asumir que, efectivamente, esta cepa es activa también en forma de bacterias viables. Se ha asumido también que todas las muestras positivas derivadas de *L. reuteri* CECT 8605 por una parte, y *B. breve* CECT 8606 por otra, ejercen su efecto por medio del mismo mecanismo de acción, independientemente del tipo de inactivación o tratamiento sufrido.

Los ensayos que presentaremos se realizaron para tratar de demostrar o descartar cuatro hipótesis:

1. La cepa es capaz de hidrolizar el fluoresterol provocando una degradación del fluoróforo y, por consiguiente, una pérdida de fluorescencia por célula.
2. La cepa o factores solubles liberados por ella, tienen capacidad para hidrolizar las sales biliares que forman parte de las micelas que transportan el colesterol hasta el enterocito, impidiendo su transporte e internalización.
3. La cepa o factores solubles liberados por ella, actúan a nivel de transportador de membrana NPC1L1, inhibiendo o reprimiendo su expresión, reduciendo de esta forma el transporte de fluoresterol al interior de la célula intestinal.
4. La cepa capta el fluoresterol, compitiendo con los enterocitos, por absorber esta molécula.

4.6.1. Análisis de la degradación del fluoresterol

Una razón por la cual se podría detectar una menor fluorescencia por célula en los ensayos llevados a cabo en enterocitos, podría ser que el fluoresterol fuera degradado por las muestras bacterianas. Es poco probable que esta degradación se produjera por catálisis química, y también lo es que la dotación enzimática de ambos microorganismos mantuviera su actividad tras el proceso de inactivación térmica (120 °C, 20 min). Sin embargo, decidimos comprobar esta posibilidad.

El ensayo de degradación de fluoresterol se llevó a cabo incubando las cepas *L. reuteri* CECT 8605 (MPB040) y *B. breve* CECT 8606 (MPB054), inactivadas térmicamente, a una concentración de $5 \cdot 10^8$ ufc/mL, con 5 µg/mL de fluoresterol en micelas, a 37 °C y oscuridad, es decir, en las mismas condiciones empleadas en el ensayo celular. En paralelo, como controles de autofluorescencia, se realizó la misma incubación de cada muestra pero sin micelas de fluoresterol. A tiempo cero y cada hora de incubación se recogieron muestras de 200 µL de cada reacción y se midió su fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm en un lector de placas GENios (TECAN). Como en el resto de los ensayos, cada muestra

se analizó por triplicado, mostrándose la media de los datos obtenidos \pm el intervalo de confianza (Figura 4.19).

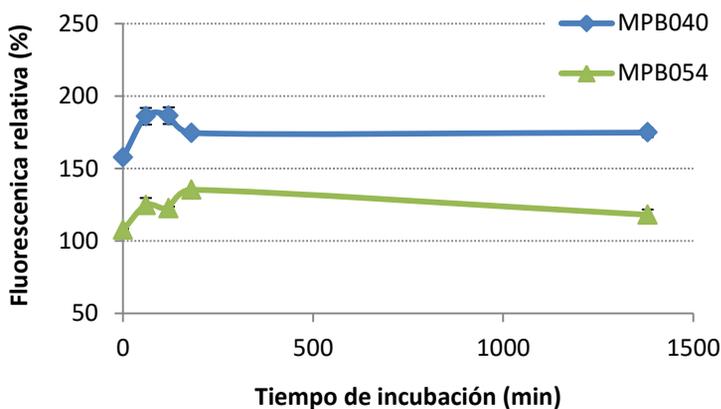


Figura 4.19. Fluorescencia asociada al fluoresterol tras una incubación de 23 h con muestras inactivadas térmicamente de *L. reuteri* CECT 8605 (MPB040) y *B. breve* CECT 8606 (MPB054). La fluorescencia relativa está calculada con referencia a una solución de micelas de fluoresterol (5 μ g/mL) en PBS, incubada en las mismas condiciones.

Los resultados revelaron que la fluorescencia asociada al fluoresterol no disminuye durante 23 horas de incubación con ninguna de las dos muestras. Observamos un ligero incremento en la fluorescencia en los primeros tiempos de incubación, posiblemente debido a alteraciones en la solubilidad del fluoresterol. Estos resultados permitieron descartar que *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 reduzcan la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 debido a que induzcan la degradación de dicho análogo del colesterol.

4.6.2. Actividad hidrolasa de sales biliares (HSB)

La existencia de esta actividad enzimática en alguna de las cepas vivas de la colección de muestras se comprobó mediante un método bioquímico (ver apartado 4.2), sin que se detectara ningún microorganismo que destacara significativamente por poseer dicha actividad. Sin embargo, *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 vivas

(CECT 8605 y CECT 8606 en figura 4.3) fueron dos de las cepas bacterianas que mostraron cierta capacidad de hidrolizar sales biliares en dichos ensayos.

La validez de nuestro método experimental, basado en la absorción de fluoresterol por enterocitos HT-29 para detectar actividad hidrolasa de sales biliares se ha demostrado previamente (Figura 4.16). Por ello, la inhibición de la absorción de fluoresterol que muestran *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 vivos (Figura 4.17.B y 4.17.D, respectivamente), en dicho modelo experimental, podría deberse a su capacidad de hidrolizar sales biliares. Esta actividad enzimática, previsiblemente, no estará presente en nuestras bacterias sometidas a un proceso de inactivación térmico, como el empleado para generar nuestra colección de muestras (120 °C durante 20 minutos). Esto se puede observar en los resultados obtenidos al comprobar la inhibición de la absorción de fluoresterol que exhibe la cepa *L. plantarum*, aislado comercial con actividad HSB, al ser ensayada en forma de células viables y en forma de células inactivadas térmicamente (Figura 4.20). Comprobamos como la reducción de la absorción de fluoresterol, debida a su actividad HSB, desaparece en los ensayos realizados con células inactivadas. Por el contrario, *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 siguen manteniendo su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol, tras ser inactivados térmicamente. Estos resultados indican que la capacidad de hidrolizar sales biliares que muestran estas dos cepas no parece ser el principal mecanismo por el cual ejercen su actividad inhibitoria.

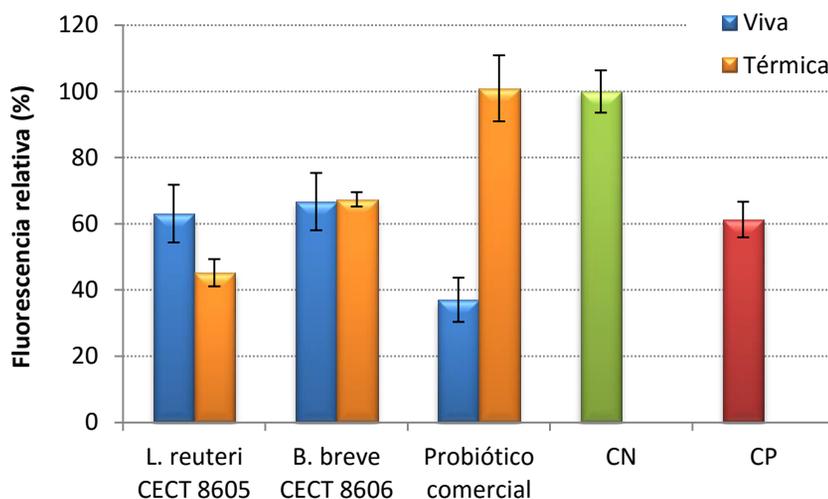


Figura 4.20. Fluorescencia intracelular de células HT-29, tras 24 horas de incubación con las cepas *L. reuteri* CECT 8605, *B. breve* CECT 8606 y una cepa comercial de *L. plantarum*. Las muestras se ensayaron en condiciones estándar (5.10^8 ufc/mL) vivas (azul) y tras ser inactivadas térmicamente (120 °C durante 20 min, naranja). CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba.

4.6.3. Transportador de membrana *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1)

El transportador NPC1L1, presente en las células del epitelio intestinal y hepatocitos, se ha identificado como un mediador crítico en la absorción intestinal de colesterol (Altmann et al., 2004). Por lo tanto, su inhibición, bloqueo o, incluso, la represión de su síntesis podría explicar la reducción de la absorción de fluoresterol que las muestras probióticas seleccionadas inducen en enterocitos HT-29.

4.6.3.1. Inhibición del receptor NPC1L1

La proteína NPC1L1 es una proteína de membrana en la que detectar una interacción directa con las muestras probióticas requeriría técnicas especialmente complejas y difíciles de abordar en el contexto de nuestro plan de trabajo. Por este motivo, se estudió si *L. reuteri* CECT 8605 inhibía o inactivaba el receptor NPC1L1 mediante dos estrategias indirectas:

- A. Eliminando el potasio del medio de cultivo, indispensable en la formación de las vesículas de clatrina, asociadas a la internalización del colesterol por acción de NPC1L1.
- B. Inhibiendo el transportador de membrana NPC1L1 por medio de ezetimiba.

A. Eliminación de potasio del medio de cultivo

El potasio es necesario para la formación de vesículas de clatrina (Brown et al., 2007), mecanismo por el cual se internaliza el colesterol a través del transportador NPC1L1. Asumimos que eliminando el potasio del medio de cultivo de enterocitos HT-29, el transporte de colesterol a través de NPC1L1 estaría completamente bloqueado. En estas condiciones, la inhibición de dicho transportador por las muestras bacterianas sería enmascarada por la imposibilidad de la formación de vesículas de clatrina.

Para comprobar esta hipótesis, tras 24 horas de incubación de los cultivos de enterocitos HT-29 con *L. reuteri* CECT 8605 ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) inactivado térmicamente, se eliminó el medio de cultivo y se realizaron varios lavados con tampón libre de potasio (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ y 1 mg/mL D-glucosa, pH 7,4), con una incubación de 1 hora en dicho tampón y 2 lavados más, tratando de eliminar completamente el potasio del medio extracelular. Por último, se llevó a cabo el ensayo de absorción de fluoresterol, en condiciones estándar pero sin presencia de potasio en el tampón de incubación (ver apartado 3.7.4 de “Materiales y Métodos”).

Los datos de fluorescencia interna por célula obtenidos por citometría reflejaron que la eliminación del potasio del medio de cultivo reduce la absorción de fluoresterol, lo que podría deberse a una deficiencia en la formación de las vesículas de clatrina. En estas condiciones, la presencia de *L. reuteri* CECT 8605 provoca una mayor reducción en la fluorescencia por célula que la debida únicamente a la deficiencia en iones K⁺ (Figura 4.21).

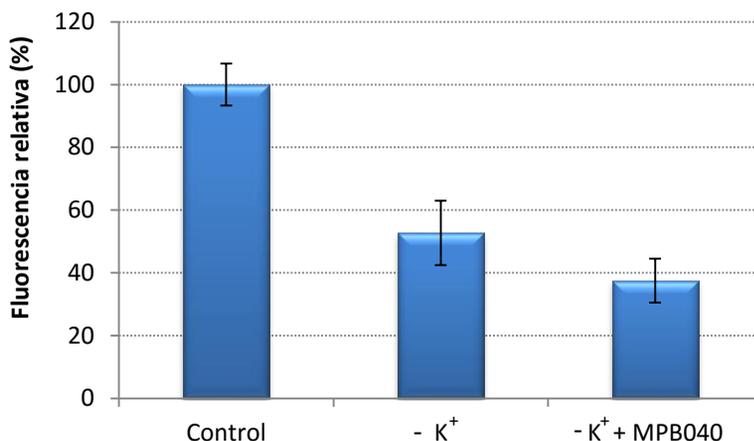


Figura 4.21. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras la incubación de 2 horas con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tres condiciones: Control: medio de cultivo HT-29 estándar; -K⁺: con tampón libre de iones potasio y -K⁺ y MPB040: con tampón libre de iones potasio y la cepa *L. reuteri* CECT 8605 inactivada térmicamente (MPB040).

El efecto aditivo sobre la inhibición de absorción de fluoresterol, de *L. reuteri* CECT 8605 sobre el efecto de la depleción de potasio, condiciones en las que podríamos asumir que el transporte de fluoresterol a través de NPC1L1 está abolido, podría interpretarse como que la muestra bacteriana actúa por medio de un mecanismo distinto a la absorción de fluoresterol a través de este transportador, mediado por vesículas de clatrina.

B. Inhibición del transportador de membrana NPC1L1 por ezetimiba

Un efecto similar al inducido por la depleción de potasio en los cultivos de enterocitos HT-29 podría obtenerse mediante un inhibidor específico de NPC1L1 como es la ezetimiba. De nuevo, tuvimos que asumir que la máxima concentración de ezetimiba efectiva (150 μM) provocaría que la actividad de NPC1L1 estaría completamente abolida en nuestro modelo *in vitro*. En estas condiciones, en presencia de ezetimiba 150 μM , la co-incubación con *L. reuteri* CECT 8605 (5.10⁸ ufc/mL) indujo una mayor inhibición de absorción de fluoresterol, cuantificada por citometría, en los

cultivos de enterocitos (Figura 4.22), que la observada en los cultivos incubados sólo con ezetimiba.

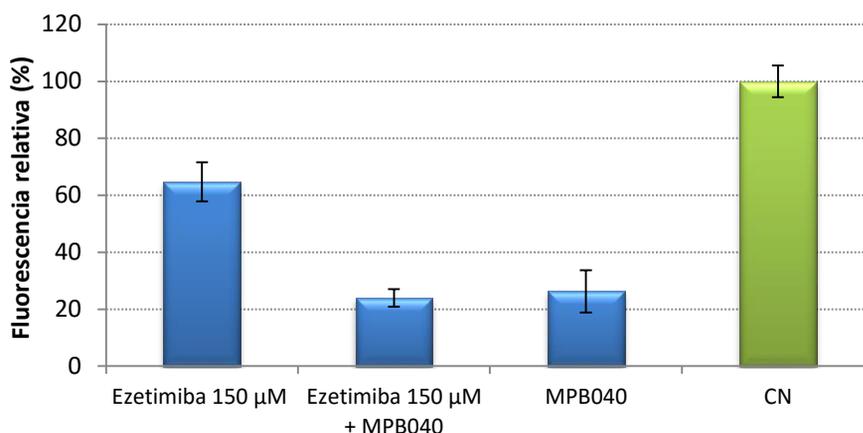


Figura 4.22. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras ser incubadas con ezetimiba (150 µM), ezetimiba (150 µM) + *L. reuteri* CECT 8605 ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) y *L. reuteri* CECT 8605 ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) inactivado térmicamente (MPB040). CN: control negativo de células HT-29 sin muestra.

Tal y como observamos en los ensayos de depleción de potasio, la inhibición de absorción de fluoresterol en los enterocitos HT-29 inducidos por la máxima concentración de ezetimiba factible y por *L. reuteri* CECT 8605 son hechos aditivos que parecen indicar que sus dianas, o los mecanismos a través de los cuales ejercen su efecto, son distintos.

4.6.3.2. Efecto sobre la expresión del gen NPC1L1

La represión de la síntesis del receptor NPC1L1, a nivel de transcripción, podría explicar la reducción en la absorción de fluoresterol por los enterocitos HT-29 inducida por las muestras bacterianas seleccionadas. Esta hipótesis se comprobó empleando muestras de ARN total de células HT-29 cultivadas durante 24 horas con $5 \cdot 10^8$ ufc/mL de las cepas *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, tratadas térmicamente (MPB040 y MPB054, respectivamente). Como controles negativos se empleó ARN extraído de células incubadas con muestras que no habían mostrado efecto en ensayos de inhibición

de absorción de fluoresterol (MPB158 y MPB185) y de células incubadas con PBS como condición de referencia. Tras la extracción de ARN y retrotranscripción partiendo de 350 ng de ARN (ver apartado 3.10.1 y 3.10.2 de “Materiales y Métodos), se procedió al análisis mediante PCR cuantitativa (ver apartado 3.10.4 de “Materiales y Métodos”), cuantificando los transcritos del gen NPC1L1 por medio de los cebadores hNPC1L1_D y hNPC1L1_R, y los transcritos del gen control GAPDH con los cebadores hGAPDH_Rw y hGAPDH_Fw. La amplificación se realizó en condiciones estándar con una temperatura de hibridación de 50 °C. Los valores de expresión génica se normalizaron mediante el procedimiento descrito por Willems (Willems et al., 2008; Figura 4.23).

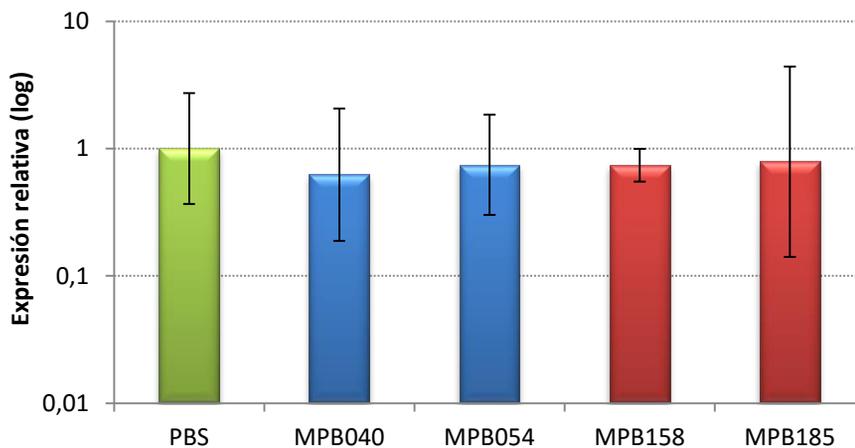


Figura 4.23. Expresión génica relativa de NPC1L1 en células HT-29 incubadas con las muestras: *L. reuteri* CECT 8605 tratado térmicamente (MPB040), *B. breve* CECT 8606 tratado térmicamente (MPB054), *L. gasseri* BT 817 inactivado con H₂O₂ (MPB158) e inactivado con etanol (MPB185) y un control de referencia con PBS. Las barras de error representan el intervalo de confianza para $\alpha=0,05$.

Los resultados de expresión relativa del gen NPC1L1, en enterocitos incubados en presencia de muestras bacterianas, con respecto al grado de expresión de enterocitos incubados con PBS, no revelaron diferencias significativas en ningún caso. La expresión de NPC1L1 fue similar en enterocitos incubados con *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 a la observada en el control de referencia (PBS) y los controles realizados con muestras bacterianas negativas en nuestros ensayos de absorción de

fluoresterol. Por ello, descartamos que el mecanismo de acción de las cepas probióticas *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 se base en la represión del gen NPC1L1.

4.6.4. Captación del fluoresterol/colesterol por la cepa probiótica

Llegados a este punto, en el que hemos descartado que *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, en nuestras condiciones de ensayo, ejerzan su actividad inhibitoria degradando el fluoresterol, hidrolizando las sales biliares que forman las micelas transportadoras de fluoresterol/colesterol o alterando la acción del receptor de membrana NPC1L1, nos planteamos estudiar la posibilidad de que las muestras bacterianas fueran capaces de captar o absorber fluoresterol y evitar, de esta forma, su absorción por los enterocitos.

Los ensayos que realizamos para abordar este estudio se diseñaron para tratar de detectar la fluorescencia asociada al fluoresterol en células de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 incubadas con micelas de fluoresterol. Concretamente, se incubaron con fluoresterol (5 µg/mL) durante 2 horas a 37 °C las siguientes suspensiones bacterianas: *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) tratados térmicamente (MPB040 y MPB054). Como controles incluimos tres muestras que resultaron negativas en la búsqueda de actividad inhibitoria de absorción de fluoresterol: *Leuconostoc mesenteroides* BT 577 control vivo (MPB022) e inactivado térmicamente (MPB049) y *Lactobacillus reuteri* BT 836 inactivado térmicamente (MPB042). Las muestras bacterianas fueron también sometidas a una tinción con bromuro de etidio, para facilitar la identificación de la población bacteriana en el análisis mediante citometría de flujo (ver apartado 3.8.2 de “Materiales y Métodos”).

Los resultados obtenidos al cuantificar la fluorescencia únicamente debida al fluoresterol mediante la técnica citada, mostraron que *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 tratados térmicamente (MPB040 y MPB054, respectivamente) exhibían una mayor fluorescencia por célula que las muestras control negativo (Figura 4.24.A). Además, si se tiene en cuenta el porcentaje de células fluorescentes, observamos que en el caso de las muestras MPB040 y MPB054, casi el 100 % de las bacterias de la población

analizada presentaban fluorescencia característica del fluoresterol, mientras que no se superaba el 50 % de bacterias fluorescentes en las muestras bacterianas incluidas como controles negativos (Figura 4.24.B).

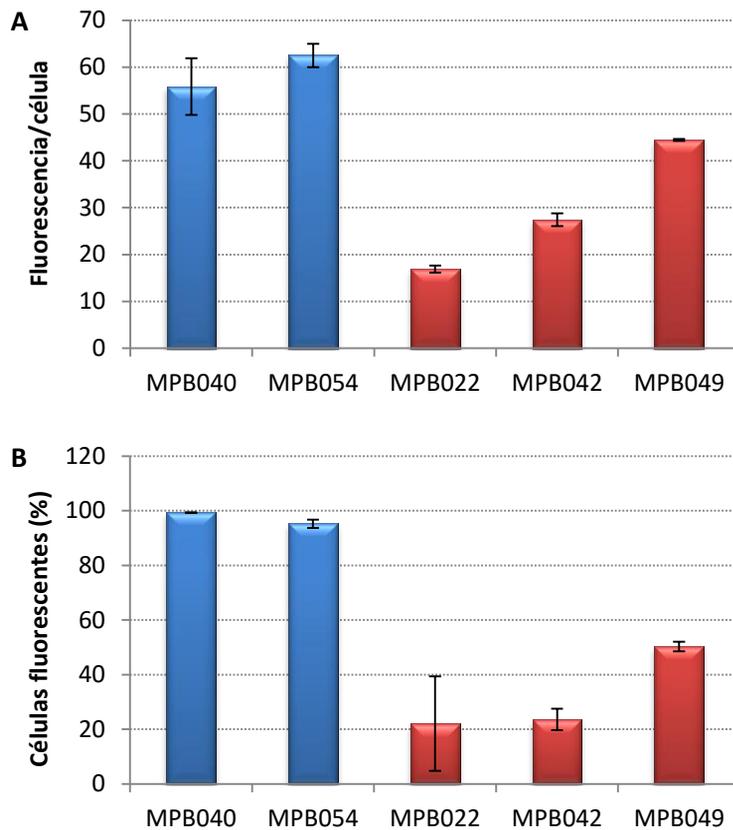


Figura 4.24. (A) Intensidad de fluorescencia por célula bacteriana, expresada como media geométrica y (B) porcentaje de células bacterianas fluorescentes, obtenido mediante citometría tras incubar las muestras indicadas ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) con fluoresterol ($5 \mu\text{g/mL}$).

La fluorescencia debida a la absorción de fluoresterol en cultivos celulares de enterocitos pudo detectarse mediante microscopía de fluorescencia convencional (Figura 4.7). En el caso del análisis de poblaciones bacterianas, la amplificación óptica necesaria (1000x) y los fenómenos de autofluorescencia, dificultó comprobar la incorporación de fluoresterol en las suspensiones bacterianas. Por este motivo, se

recurrió al uso de la microscopía laser confocal para visualizar las muestras *L. reuteri* CECT 8605 inactivada térmicamente (MPB040), *B. breve* CECT 8606 inactivada térmicamente (MPB054) y *L. reuteri* BT 836 inactivada térmicamente (MPB042; control negativo) tras ser incubadas, durante 2 horas, con micelas de fluoresterol (5 µg/mL; Figura 4.25). La identificación de las muestras bacterianas se realizó mediante tinción con DAPI, que confiere propiedades fluorescentes (excitación 358 nm/emisión 461 nm) al unirse a moléculas de ADN. En el caso de muestras procariotas, como las que nos ocupan, la tinción se localiza en el citoplasma celular.

Las imágenes obtenidas con *L. reuteri* CECT 8605 (MPB040) y *B. breve* CECT 8606 (MPB054) demuestran claramente que estas bacterias son capaces de incorporar fluoresterol en su estructura celular, a diferencia de lo que se observa con el control negativo *L. reuteri* BT 836 (MPB042). La superposición de señales obtenidas por la incorporación de fluoresterol y DAPI, además, parece indicar que el análogo de colesterol se acumula en el citoplasma bacteriano en las dos cepas (Figura 4.25). Un análisis más detallado de células de *L. reuteri* CECT 8605 (MPB040) incubadas con fluoresterol y teñidas con DAPI, sustenta que el fluoresterol parece acumularse en el citoplasma. El perfil de intensidad de la fluorescencia debida a DAPI (marcador fluorescente, que en este caso determina la localización del citoplasma) y del fluoresterol coinciden casi completamente al analizar un corte transversal virtual de una célula de *L. reuteri* CECT 8605 (MPB040). Además, al cuantificar la intensidad de fluorescencia debida a fluoresterol en células unidas apicalmente detectamos una menor intensidad en la envoltura celular en contacto entre ambas células (Figura 4.26).

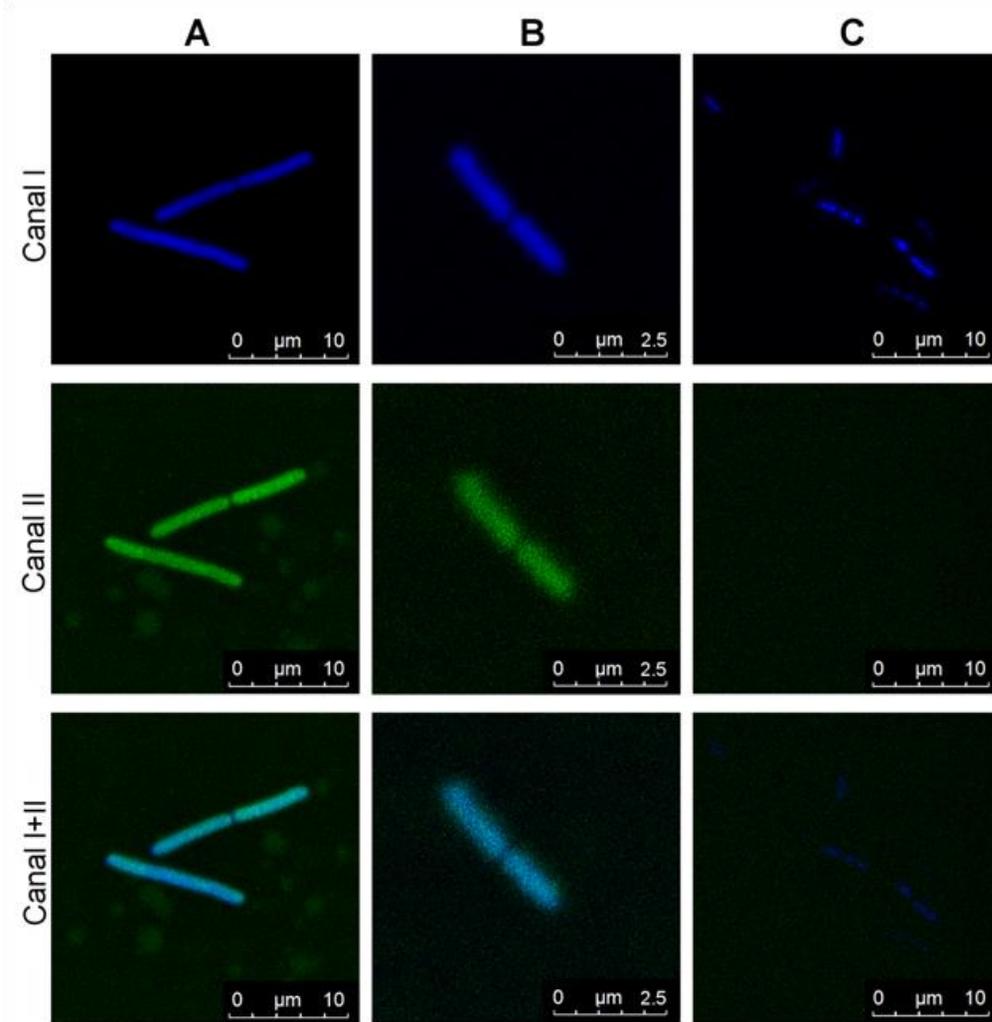


Figura 4.25. Imágenes de microscopía láser confocal de *L. reuteri* CECT 8605 (MPB040; A), *B. breve* CECT 8606 (MPB054; B) y *L. reuteri* BT 836 (MPB042; C). La captación de imágenes bajo dos condiciones de excitación/emisión de fluorescencia permite detectar bacterias teñidas con DAPI (canal I), comprobar la presencia de fluoresterol (canal II) y la superposición de ambos fluoróforos (canal I + II).

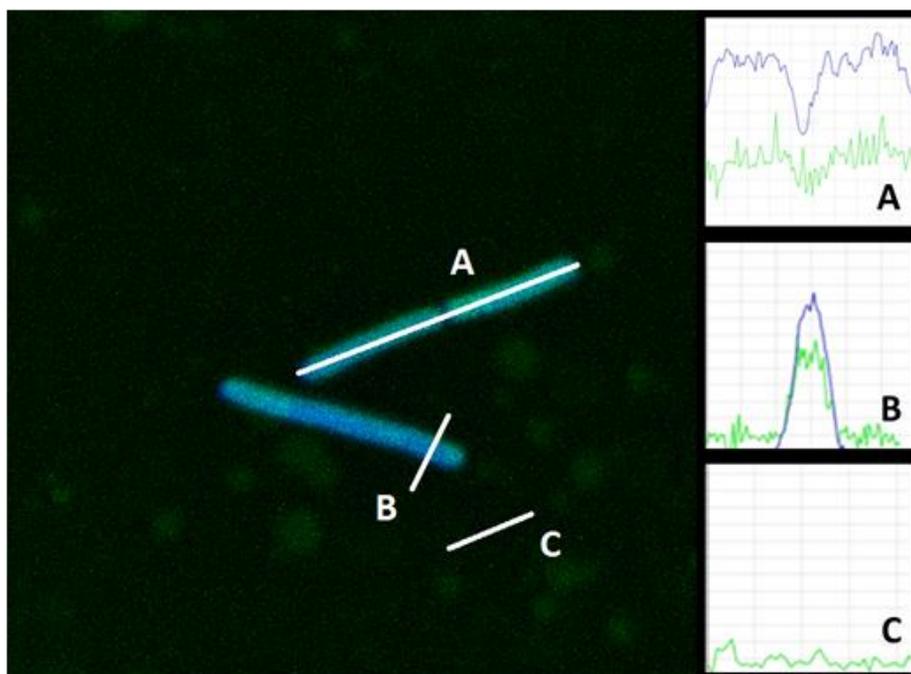


Figura 4.26. Muestra *L. reuteri* CECT 8605 (MPB040) marcada con DAPI (azul) y fluoresterol (verde). Intensidad de fluorescencia en un corte longitudinal (A) y transversal (B). (D) Intensidad de fluorescencia basal asociada a fluoresterol libre.

Los resultados obtenidos mediante citometría y microscopía demuestran que *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 poseen la capacidad de absorber fluoresterol, en nuestras condiciones de ensayo. Este hecho, junto a los resultados negativos obtenidos en los ensayos realizados para comprobar otros posibles mecanismos de acción, apunta a que ambas cepas ejercen su efecto inhibitorio gracias a que captan el fluoresterol del medio extracelular, compitiendo por tanto con los enterocitos HT-29 por este compuesto.

4.7. Adquisición de la capacidad de captar fluoresterol

El Departamento de Bioprocesos de nuestra compañía tiene como una de sus funciones la optimización de las condiciones de cultivo de cepas bacterianas. La cepa *B. breve* CECT 8606 es capaz de alcanzar una concentración de células viables en torno a $5 \cdot 10^9$ ufc/mL, al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, en las condiciones de cultivo iniciales diseñadas para este microorganismo (Tabla 3.10). En cambio, la cepa *L. reuteri* CECT 8605 mostró una concentración de bacterias viables muy baja en la misma fase de crecimiento (Tabla 3.10), por lo que fue objeto de varios ensayos de optimización de sus condiciones de cultivo. Gracias a estos ensayos, se seleccionó un nuevo medio de cultivo (medio CR20), distinto pH de crecimiento y tiempo de incubación (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Condiciones de cultivo y viabilidad de la cepa *L. reuteri* CECT 8605.

Medio de cultivo	Condiciones de cultivo	Concentración (ufc/mL)
CR20	pH 5 8 horas de cultivo	$4,1 \cdot 10^9$
General	pH 6 14 horas de cultivo	$0,6 \cdot 10^9$

La mejora en la eficiencia de las condiciones de cultivo, así como la capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos, de las muestras bacterianas obtenidas con el nuevo proceso, se comprobó en dos experimentos independientes. Se realizaron dos réplicas de fermentaciones en medio General (mGeneral), medio en el que se había cultivado habitualmente *L. reuteri* CECT 8605, y otras dos fermentaciones en las nuevas condiciones con medio CR20 (mCR20). La biomasa obtenida se inactivó mediante tratamiento térmico y se comprobó su efecto sobre la absorción de fluoresterol en células HT-29. Los resultados comparativos en cuanto a la concentración de bacterias viables y su efecto sobre la absorción de fluoresterol se muestran en la figura 4.27.

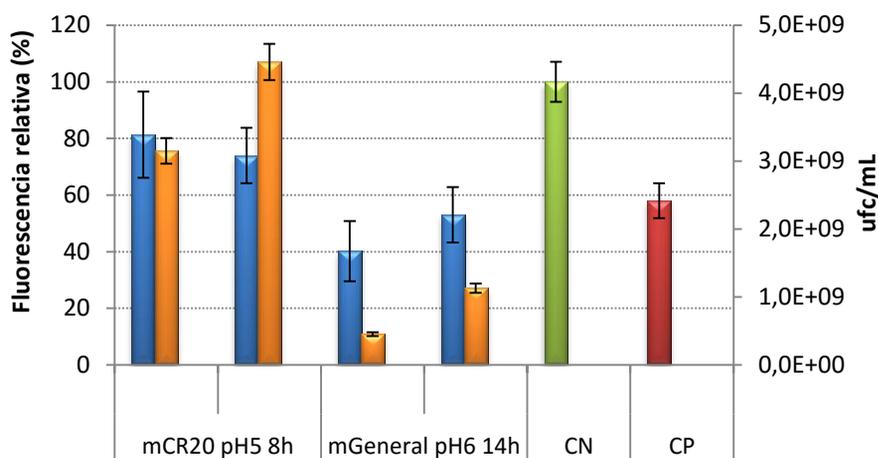


Figura 4.27. Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras ser incubados con fluoresterol (5 $\mu\text{g/mL}$) y *L. reuteri* CECT 8605 inactivado térmicamente, cultivado en dos medios distintos. En naranja se muestra la concentración de bacterias viables de los cultivos de los que se obtuvieron las muestras bacterianas. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba.

Los resultados mostraron que, efectivamente, la cepa *L. reuteri* CECT 8605 exhibe un mayor crecimiento en medio CR20 (mCR20) pH 5 tras 8 horas de cultivo en comparación con el obtenido tras 14 horas de cultivo en medio General (mGeneral) pH 6. Sin embargo, las muestras bacterianas obtenidas en mCR20 e inactivadas térmicamente, no mostraron la capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol que poseen las células de esta misma cepa cultivadas en mGeneral. Estos resultados nos llevaron a suponer que las condiciones de crecimiento son determinantes para que este microorganismo posea o no la capacidad hipocolesterolémica que detectamos en los ensayos *in vitro*.

Otro aspecto característico de las muestras de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 es que, a pesar de la baja concentración de bacterias viables que presentan, la cantidad de biomasa (en forma de peso húmedo, datos no mostrados) no es inferior en la misma proporción calculada en base a ufc/mL, aproximadamente 7 veces menos, a la biomasa de muestras obtenidas en medio CR20 pH 5. Este hecho y sus posibles implicaciones se estudiarán más adelante.

4.7.1. Tiempo de incubación de cultivos de *L. reuteri* CECT 8605

Uno de los parámetros que diferencia las dos condiciones de cultivo empleadas para obtener biomasa de *L. reuteri* CECT 8605 es el tiempo de incubación de los cultivos (12-14 horas en el caso de las condiciones iniciales y 7-8 horas en el caso de las condiciones optimizadas). Para investigar si este factor era el determinante en la adquisición de la capacidad de absorber fluoresterol por las células de *L. reuteri* CECT 8605, se llevó a cabo un ensayo cultivando dicha cepa en los dos medios (mCR20 y mGeneral), tomando muestras a distintos tiempos de cultivo. Las muestras se emplearon para cuantificar la concentración bacteriana y, tras inactivar las bacterias por calor y estandarizar su concentración, ensayar en cultivos de enterocitos HT-29 la capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol.

Observamos que en el caso de las muestras generadas a partir de medio General, las suspensiones bacterianas obtenidas a distintos tiempos de crecimiento mostraron un grado de inhibición sobre la absorción de fluoresterol y una concentración de bacterias (antes de estandarizar) similares, independientemente del tiempo de crecimiento. En cambio, cuando *L. reuteri* CECT 8605 se cultivó en medio CR20, se produjo un ligero incremento en su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol, acompañado de una leve disminución en la concentración de bacterias, en las muestras tomadas en los últimos tiempos de crecimiento (Figura 4.28).

Estos resultados no señalaron, al menos con un elevado grado de certidumbre, que el tiempo de crecimiento fuera un factor clave en el proceso de obtención de células de *L. reuteri* CECT 8605 con capacidad de absorber fluoresterol.

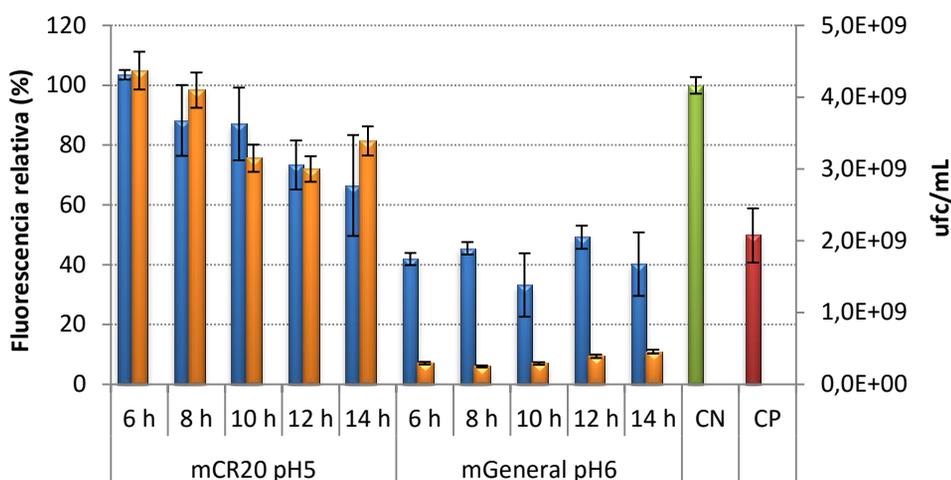


Figura 4.28. Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras ser incubados con *L. reuteri* CECT 8605 inactivado térmicamente y fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En naranja se muestra la concentración de bacterias viables de los cultivos de los que se obtuvieron las muestras. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba.

4.7.2. Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es otro parámetro que diferencia las dos condiciones empleadas para obtener células de *L. reuteri* CECT 8605. La concentración de extracto de levadura, la concentración y composición de la fuente de carbono y la concentración de di-potasio hidrógeno fosfato son los tres puntos que diferencian a los dos medios. La influencia de cada uno de estos ingredientes se ensayó modificando su concentración basal en el medio General (Tabla 4.3). Los medios de cultivo se utilizaron para obtener biomasa de *L. reuteri* CECT 8605, que se trató térmicamente antes de analizar su efecto sobre la absorción de fluoresterol en células HT29.

Los resultados de estos análisis mostraron que el efecto inhibitorio se mantenía en aquellas muestras bacterianas obtenidas en medio General como base, sin afectar significativamente las modificaciones realizadas en su composición. De igual forma, los cambios en la composición del medio CR20, diseñados para simular características del

medio General, no permitieron obtener muestras de *L. reuteri* CECT 8605 con una mayor concentración de células viables empleando como base este último medio (Figura 4.29).

Tabla 4.3. Composición parcial del medio de cultivo General y nuevas formulaciones.

Componente	g/L				
	mGeneral	Medio A	Medio B	Medio C	mCR20
Extracto de levadura	22	44	22	44	44
Glucosa	40	40	120	120	-
Maltodextrina	-	-	-	-	120
Di-Potasio hidrógeno fosfato	2	2	2	2	0,5

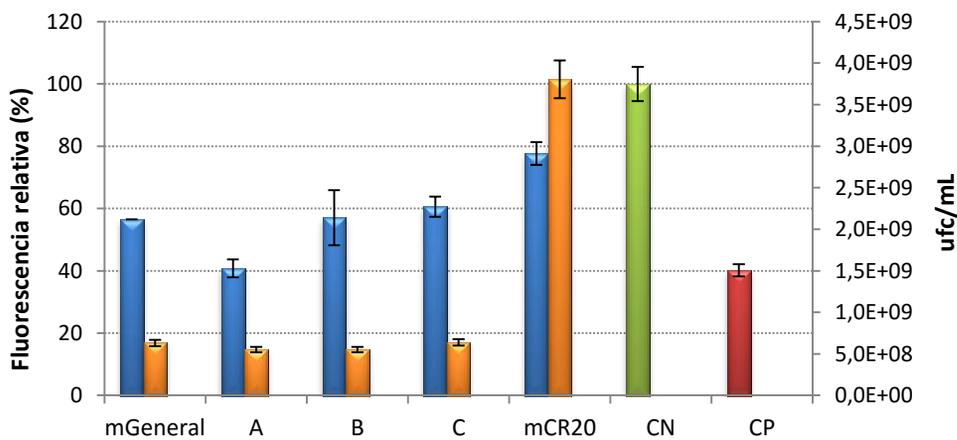


Figura 4.29. Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras ser incubados con fluoresterol (5 µg/mL) y *L. reuteri* CECT 8605 inactivado térmicamente, cultivado durante 14 h en los medios indicados en la tabla 4.3. En naranja se muestra la concentración de bacterias viables tras las 14 h de cultivo. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra y CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba.

4.7.3. Efecto del pH

El último parámetro que diferencia las condiciones de crecimiento de *L. reuteri* CECT 8605 que dan lugar a muestras de células con capacidad de absorber fluoresterol o no, es el pH del medio, que es fijado y controlado a lo largo de todo el cultivo. El pH del medio de cultivo que se empleó con el medio CR20 fue 5, mientras que el pH del medio General fue 6. Para comprobar cómo afectaba este factor a la capacidad de absorber fluoresterol por parte de las células de *L. reuteri* CECT 8605, se cultivó la cepa en medio CR20 a distintos pH y a pH libre durante 14 h. Tras el cultivo, las muestras fueron inactivadas térmicamente y, posteriormente, se analizó el efecto sobre la absorción de fluoresterol en células HT-29 (Figura 4.30).

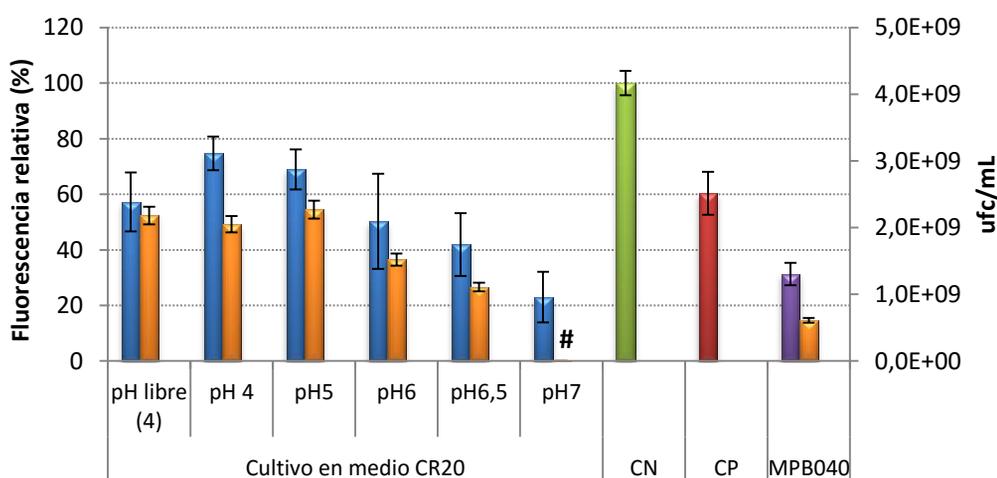


Figura 4.30. Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras ser incubadas con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con *L. reuteri* CECT 8605, cultivado en mCR20 a los pH indicados e inactivado térmicamente. En naranja se muestra la concentración bacteriana de cada uno de los cultivos tras 14 h, en mCR20 y el pH indicado. MPB040: resultados con muestra obtenida en mGeneral pH 6. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra; CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba. #Viabilidad de $2,3 \cdot 10^6$ ufc/mL.

Los resultados mostraron una correlación directa entre el efecto inhibitorio exhibido por las muestras bacterianas sobre la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 y el pH determinado durante su cultivo (Figura 4.30). Por el contrario, la viabilidad

bacteriana al final del cultivo fue indirectamente proporcional al valor de pH del medio de cultivo. Los resultados obtenidos en los ensayos realizados demuestran que el cambio de una unidad en el pH de crecimiento (de pH 5 a 6) es suficiente para incrementar significativamente la actividad inhibitoria de *L. reuteri* CECT 8605 sobre la absorción de fluoresterol, de un 25-30 % hasta un 50 %.

En este punto, quisimos averiguar si la modificación en el pH extracelular debía realizarse desde el inicio del cultivo o bien, si podríamos obtener cultivos con elevada concentración bacteriana en medio CR20 a pH 5 y “activar” la capacidad de absorber fluoresterol incubando la biomasa obtenida a pH 6 durante la fase estacionaria del cultivo bacteriano. Para ello, se cultivó la cepa *L. reuteri* CECT 8605 en medio CR20 a pH 5 y en medio CR20 a pH 5 con 40 g/L adicionales de glucosa, y tras 14 horas de cultivo se modificó el pH a 6, incubando los cultivos en estas condiciones hasta un total de 38 horas. Posteriormente, las muestras bacterianas obtenidas a distintos tiempos fueron inactivadas térmicamente y se analizó su efecto sobre la absorción de fluoresterol en células HT-29.

Las muestras obtenidas a las 14 horas de incubación, a un pH de 5, mostraron una viabilidad esperada ($5 \cdot 10^9$ ufc/mL), que no se modificó en muestras posteriores. Como era esperado, las muestras obtenidas en medio CR20 a pH 5 no inhibieron la absorción de fluoresterol, ni a las 14 horas de incubación (pH 5), ni tras 10 horas (24 horas totales) o 24 horas (38 horas totales) adicionales de incubación a pH 6. De igual modo, las muestras obtenidas por cultivo en medio CR20 suplementado con glucosa y 14 horas de incubación a pH 5, tampoco fueron capaces de inhibir la absorción de fluoresterol. Sin embargo, una vez modificado el pH a un valor de 6 y tras 10 horas y 24 horas más de incubación en estas condiciones, las células de *L. reuteri* CECT 8605 obtenidas del medio CR20 suplementado con glucosa, exhibieron actividad inhibitoria sobre la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos (Figura 4.31).

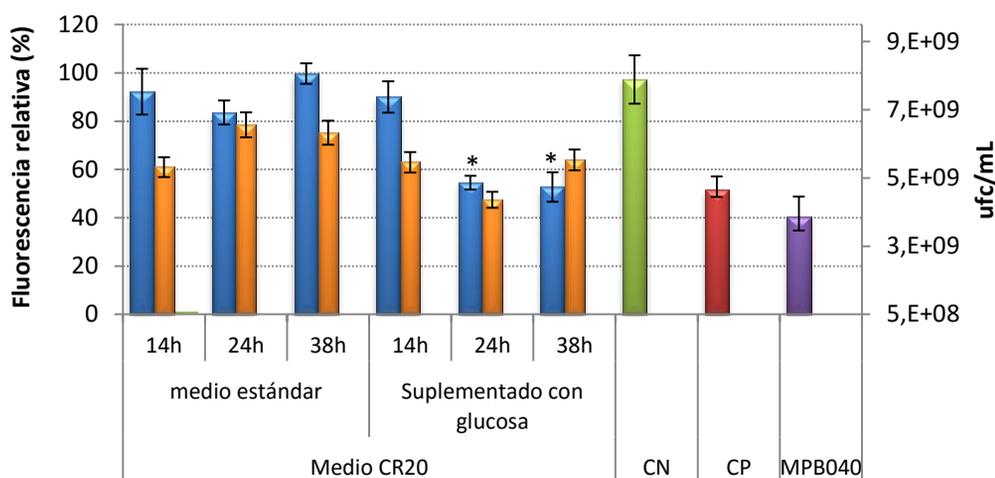


Figura 4.31. Fluorescencia intracelular de células HT-29 tras la incubación con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y *L. reuteri* CECT 8605 inactivado térmicamente; cultivado en mCR20, estándar y suplementado con glucosa, a pH 5 hasta las 14 horas de cultivo y después a pH 6 hasta los tiempos indicados. En naranja se muestra la concentración bacteriana de cada uno de los cultivos de los que se obtuvieron las muestras. MPB040: resultados obtenidos con *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en mGeneral pH 6. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra, CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba.

La presencia de una mayor concentración de fuente de carbono es la única diferencia entre las dos condiciones ensayadas. Esto puede indicar que la modificación del pH extracelular induce la capacidad de absorber fluoresterol únicamente en células de *L. reuteri* CECT 8605 metabólicamente activas, estado que es promovido por la mayor concentración de la fuente de carbono en el caso de las muestras obtenidas a partir de medio CR20 suplementado con glucosa.

4.7.3.1. Especificidad de la capacidad inhibitoria por cambio de pH del medio de cultivo

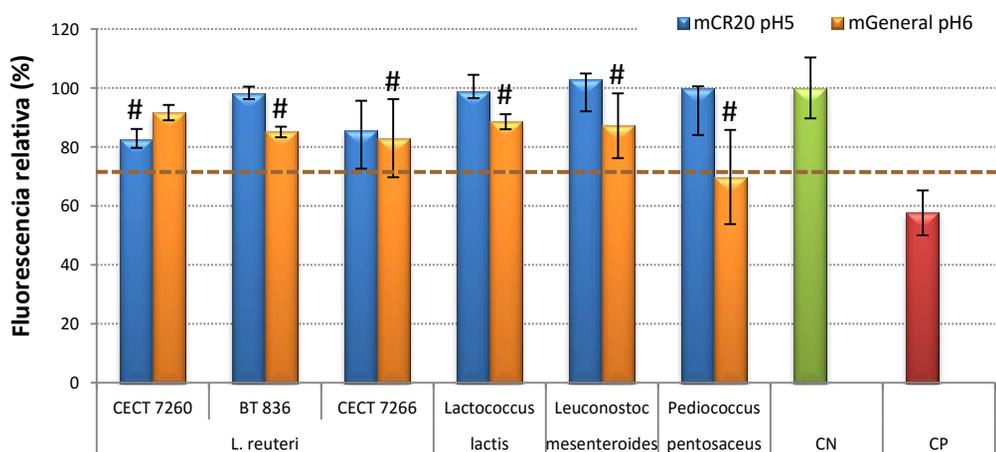
La única cepa bacteriana de la colección de muestras que ha sido analizada tras ser cultivada en diferentes condiciones ha sido *L. reuteri* CECT 8605. Por lo tanto, no conocemos si otras cepas pueden sufrir un fenómeno similar, es decir, exhibir capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 únicamente al ser cultivadas en condiciones específicas. Por este motivo, se decidió comprobar si este fenómeno se

daba en otras cepas. Para ello, se cultivó en varios medios una fracción de las especies que forman la colección de cepas empleada en esta memoria y de otras cepas de las que disponemos en los laboratorios de Biosearch S.A.: (i) Las cepas que se cultivaron originalmente en medio General pH 6 o medio CR20 pH 5, se cultivaron adicionalmente en el medio necesario para obtener muestras en las dos condiciones. (ii) Las cepas que originalmente se obtuvieron en un medio distinto al General y CR20, se cultivaron en estos dos medios, disponiendo por tanto de 3 muestras de biomasa de estas estirpes bacterianas. (iii) Por último, las cepas del género *Bifidobacterium*, que no son viables en los medios General y CR20, se cultivaron en su medio original, pero empleando 3 valores de pH: 5; 5,5 y 6, obteniendo también en este caso 3 muestras de cada cepa bacteriana. Una vez obtenidas las suspensiones bacterianas, se inactivaron térmicamente y se analizó su efecto sobre la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29.

Tras analizar los resultados (Figura 4.32), observamos que ninguna de las otras cepas de *L. reuteri* estudiadas fue capaz de inhibir la absorción de fluoresterol, independientemente del medio de cultivo empleado para su crecimiento. Tampoco detectamos variaciones significativas en la actividad inhibitoria de cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*. *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 sí mostró distinto comportamiento en los ensayos realizados en enterocitos, dependiendo del medio de cultivo empleado para su crecimiento. Sin embargo, dicho comportamiento fue en sentido contrario (activo a pH 5, inactivo a pH 6) al observado en *L. reuteri* CECT 8605, al igual que el cambio producido en la concentración de bacterias viables de esta cepa (Tabla 4.4). Las cepas de *Lactobacillus salivarius* produjeron un incremento en la actividad inhibitoria de patrón similar a *L. reuteri* CECT 8605, es decir, al modificar el valor de pH de 5 a 6, si bien el incremento en su actividad no fue de magnitud comparable a lo observado en *L. reuteri* CECT 8605. Además, tras el cambio de las condiciones de cultivo no observamos ningún efecto sobre la viabilidad de estas cepas que fuera similar a lo observado en *L. reuteri* CECT 8605.

Tabla 4.4. Concentración bacteriana de los cultivos al finalizar cada una de las fermentaciones y condiciones de crecimiento (medio de cultivo y pH).

Medio	Específico (Tabla 3.9)		CR20 pH 5	General pH 6	Bf04				
	pH				pH 5	pH 5,5	pH6		
<i>L. reuteri</i>	CECT7260		$6,1 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^9$					
	BT 836		$1,6 \cdot 10^{10}$	$3,1 \cdot 10^9$					
<i>Lc. lactis</i>	CECT7266		$5,2 \cdot 10^9$	$3,5 \cdot 10^9$					
	BT 575		$4,3 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^{10}$					
<i>Le. mesenter.</i>	BT 577		$2,4 \cdot 10^9$	$6,1 \cdot 10^9$					
<i>P. pentosac.</i>	BT 837		$2,3 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$					
<i>L. fermentum</i>	CECT5716	5	$7,2 \cdot 10^9$	$5,5 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^{10}$				
<i>L. coryniformis</i>	CECT5711	6	$5,8 \cdot 10^9$	$6,2 \cdot 10^8$	$6,4 \cdot 10^9$				
<i>L. salivarius</i>	CECT7261		6	$1,1 \cdot 10^{10}$	$7,4 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^9$			
	CECT5713	5	$5,6 \cdot 10^9$			$9,9 \cdot 10^9$	$3,9 \cdot 10^9$		
<i>L. gasseri</i>	CECT5714		4,5	$6,1 \cdot 10^9$	$7,15 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^6$			
	CECT8606						$3,3 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^9$
<i>B. breve</i>	CECT7263						$2,3 \cdot 10^9$	$8,9 \cdot 10^9$	$8,8 \cdot 10^9$

**Figura 4.32.** Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras una incubación con fluoresterol (5 µg/mL) y bacterias inactivadas térmicamente, cultivadas en los medios específicos (morado), medio CR20 pH 5 (azul) y medio general pH 6 (naranja). CN: control negativo de células HT-29 sin muestra, CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba. #Medio originalmente empleado para la obtención de muestras de la colección o su empleo general.

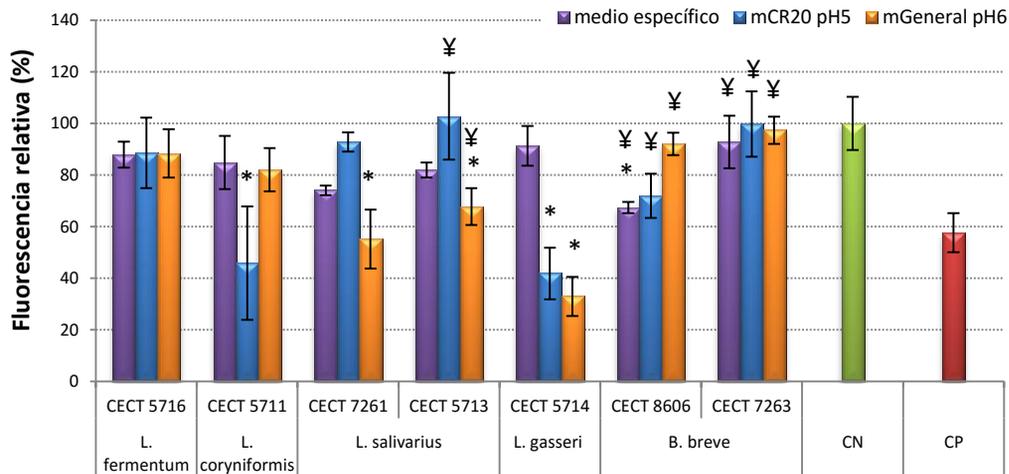


Figura 4.32 (Cont.). Fluorescencia intracelular de enterocitos HT-29 tras una incubación con fluoresterol (5 µg/mL) y bacterias inactivadas térmicamente, cultivadas en los medios específicos (morado), medio CR20 pH 5 (azul) y medio general pH 6 (naranja). CN: control negativo de células HT-29 sin muestra, CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba. ¥ Cepas cultivadas en medio Bf04 a distintos pH. *muestras consideradas positivas (inhibición de la absorción de fluoresterol superior al 30 % y estadísticamente significativo $p < 0,05$).

El caso de *L. gasseri* CECT 5714 es destacable, ya que aumenta su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol, de manera inversamente proporcional a la concentración de bacterias viables obtenida en cada medio de cultivo ensayado. Además, estos hechos (incremento en la capacidad inhibitoria y descenso en la concentración celular) muestran una mayor magnitud a medida que el pH de cultivo es más alcalino. Sin embargo, las muestras activas de este microorganismo, no presentaron una concentración de biomasa anormalmente elevada en relación a su concentración de bacterias viables, tal y como ocurre en las muestras de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6. Globalmente, y quizá exceptuando el caso de *L. gasseri* CECT 5714, no observamos un comportamiento similar al detectado en *L. reuteri* CECT 8605, en cuanto a una capacidad de crecer y de inhibir la absorción de fluoresterol dependientes del cambio de una unidad de pH extracelular, en ninguno de los microorganismo ensayados.

4.8. Caracterización de *Lactobacillus reuteri* CECT 8605

Como hemos visto, el pH de cultivo determina la capacidad de la cepa *L. reuteri* CECT 8605 de inhibir la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos HT29 (Figura 4.30), y esta actividad está relacionada con su habilidad de captar fluoresterol, como hemos visto en ensayos previos (ver apartado 4.6.4). La relación entre ambos hechos puede verse en la diferente capacidad que exhiben células de *L. reuteri* CECT 8605 cultivadas en medio General pH6, positivas en los ensayos en enterocitos HT-29, y en medio CR20 pH5, negativos en dichos ensayos celulares, para captar fluoresterol (Figura 4.33).

Otra característica, mencionada previamente, que diferencia las muestras de biomasa de *L. reuteri* CECT 8605 obtenidas en estas dos condiciones es la menor concentración de células viables que se obtienen en medio General. Aproximadamente, los cultivos de *L. reuteri* CECT 8605 en medio General pH 6 pueden mostrar hasta un orden menos de bacterias viables que los realizados en medio CR20 pH 5. Sin embargo, la cantidad biomasa cuantificada como masa húmeda o densidad óptica (600 nm), obtenida en cada uno de los medios de cultivo no difiere en la misma proporción. Habitualmente, los cultivos obtenidos en medio General poseen aproximadamente un 20 – 30 % menos de biomasa que los cultivos en medio CR20. Por ello, al estandarizar las muestras de la colección en base a la concentración de bacterias viables ($5 \cdot 10^9$ bacterias/mL) los stocks de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General tienen una concentración de biomasa significativamente superior a los stocks obtenidos tras cultivar la misma cepa en medio CR20 (aproximadamente 3 – 4 veces más biomasa cuantificada por densidad óptica a 600 nm o volumen de peso húmedo; Tabla 4.5).

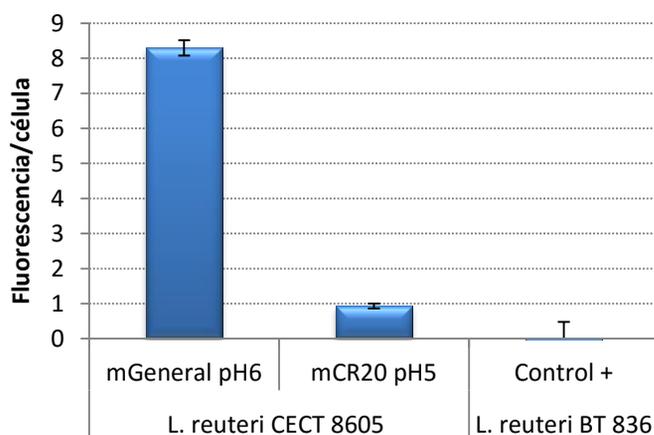


Figura 4.33. Intensidad de fluorescencia interna bacteriana tras incubar las muestras indicadas ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) tratadas térmicamente con fluoresterol ($5 \mu\text{g/mL}$).

Tabla 4.5. Comparación de la biomasa y concentración en ufc/mL tras el cultivo de *L. reuteri* CECT 8605 en las dos condiciones de crecimiento que se indican.

	Cultivo		Muestra	
	Biomasa (g/L)	Concentración (ufc/mL)	Biomasa (g/L)	Concentración (ufc/mL)
mGeneral pH 6 14 h	1,4	$0,6 \cdot 10^9$	11,95	$5 \cdot 10^9$
mCR20 pH 5 8h	2,1	$4,1 \cdot 10^9$	2,80	$5 \cdot 10^9$

Con estos precedentes, nos planteamos si la diferencia en la actividad inhibitoria sobre la absorción de fluoresterol que muestra *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en las dos condiciones podría ser debida a la mayor concentración de biomasa de las muestras (formada por células no viables, restos celulares...) obtenida en medio General. Esta posibilidad se analizó estudiando la inhibición sobre la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 que ejercieron suspensiones de *L. reuteri* CECT 8605, inactivadas térmicamente, y estandarizadas en base a células viables ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) y en base a densidad óptica ($DO_{600\text{nm}} = 0,2$ unidades). Los resultados de este ensayo mostraron de nuevo cómo *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 inhibía la absorción de fluoresterol y cómo el mismo microorganismo cultivado en medio CR20 no ejercía el

mismo efecto, tampoco al ensayar la misma cantidad de biomasa que en las muestras obtenidas en medio General (Figura 4.34).

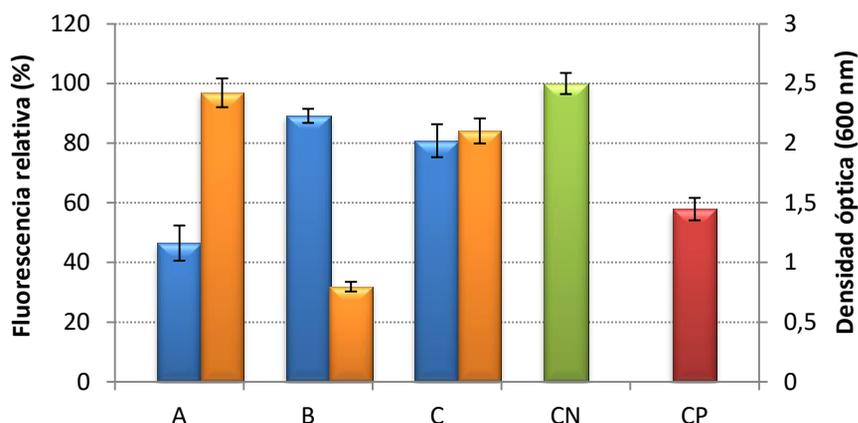


Figura 4.34. Fluorescencia intracelular de células HT-29 incubadas con fluoresterol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en (A) medio General ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL; $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,2$), (B) medio CR20 ($5 \cdot 10^8$ ufc/mL) y (C) medio CR20 ajustando $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a 0,2. CN: control negativo de células HT-29 sin muestra, CP: células HT-29 incubadas con ezetimiba. En naranja se muestra la densidad óptica de la muestra bacteriana incubada con las células HT-29 ($\text{DO}_{600\text{nm}}$; naranja).

4.8.1. Características bioquímicas de *Lactobacillus reuteri* CECT 8605

En ensayos previos, se observó que el fluoresterol absorbido por *L. reuteri* CECT 8605 se acumula principalmente en el citoplasma celular (ver apartado 4.6.4), por lo que podríamos pensar que una de las posibles diferencias entre *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General y en medio CR20 debe residir en la envoltura celular, lo que implicaría cambios en la permeabilidad bacteriana. Con el objeto de estudiar esta posibilidad, tomamos fotografías mediante microscopía electrónica de transmisión de células de *L. reuteri* CECT 8605 cultivadas en ambas condiciones (sin inactivar). Las imágenes obtenidas, gracias a la colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Domínguez de la Universidad de Granada, revelaron diferencias notables (Figura 4.35): las bacterias cultivadas en medio CR20 pH 5 mostraron una morfología y densidad

electrónica normales y habituales en especies del género *Lactobacillus*. Por el contrario, *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 presentó células con bordes poco definidos y una densidad no homogénea y difusa que puede interpretarse como la existencia de una envoltura celular degradada.

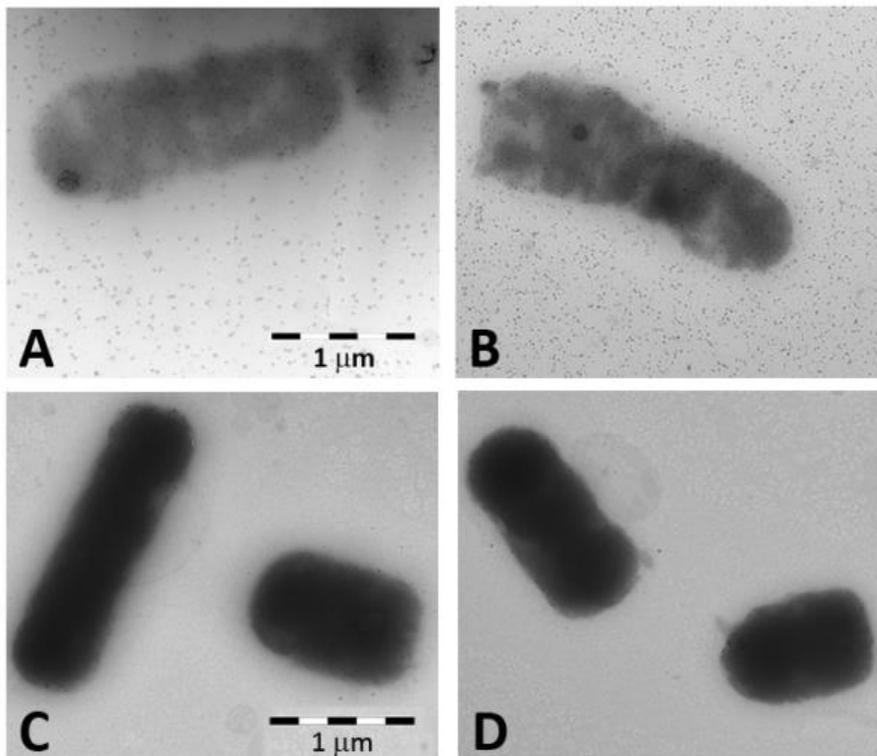


Figura 4.35. Imagen de microscopía electrónica de la cepa *L. reuteri* CECT 8605 cultivada en medio General a pH6 (A,B) y en medio CR20 a pH 5 (C,D).

La pared celular es la primera barrera que encontraría el fluoresterol para acceder al citoplasma de la bacteria. Dado que en bacterias Gram positivas, como *L. reuteri* CECT 8605, el peptidoglicano representa hasta el 90 % de la pared celular, se decidió analizar si existen diferencias en la concentración de peptidoglicano entre células obtenidas mediante las dos condiciones de cultivo (mGeneral pH 6 y mCR20 pH 5).

El análisis del contenido en peptidoglicano estuvo marcado por dificultades técnicas, propias de la metodología y también ocasionadas por la naturaleza de las muestras. Por este motivo, asumimos como semi-cuantitativos los resultados de estos ensayos. Aun así, *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio CR20 pH 5 parece poseer mayor cantidad de peptidoglicano, expresado como microgramos por miligramo de peso seco, que cuando se cultiva en medio General pH 6 (Figura 4.36).

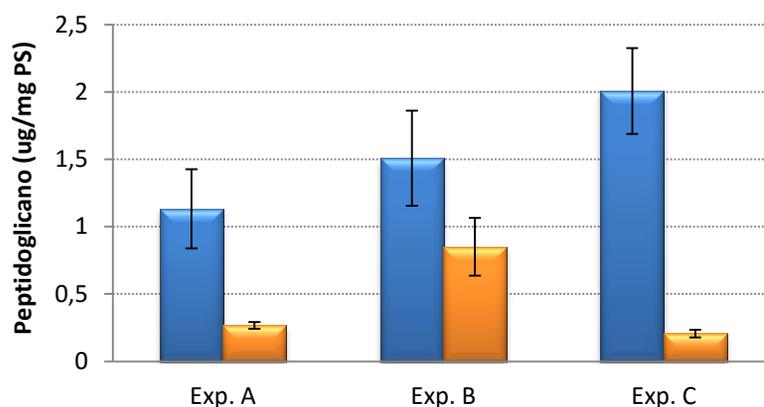


Figura 4.36. Concentración de peptidoglicano en μg por mg de peso seco para tres fermentaciones distintas (Exp. A, B y C), de la cepa *L. reuteri* CECT 8605 en medio CR20 pH5 (azul) y en medio General pH6 (naranja).

Uno de los procesos biológicos que podría alterar la envoltura bacteriana de *L. reuteri* CECT 8605, podría ser la acción de enzimas líticas endógenas. Estas enzimas tienen como función degradar la pared bacteriana con distintos objetivos, dependiendo de la naturaleza de la enzima (lisis celular, división celular, renovación y/o maduración de la pared...; Vollmer et al., 2008).

Para detectar posibles proteínas líticas en *L. reuteri* CECT 8605, se realizó un zimograma en condiciones semi-nativas en geles de poliacrilamida empleando *Micrococcus luteus* como sustrato. Este microorganismo es muy sensible a la actividad de proteínas líticas y sus células se degradan rápidamente en presencia de enzimas hidrolasas de peptidoglicano. Las muestras que se resolvieron en los zimogramas fueron extractos proteicos obtenidos a partir de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio CR20 a

distintos pH y medio General pH6 (Figura 4.37). Las muestras se analizaron por duplicado y estandarizando la cantidad de proteína total en cada pocillo.

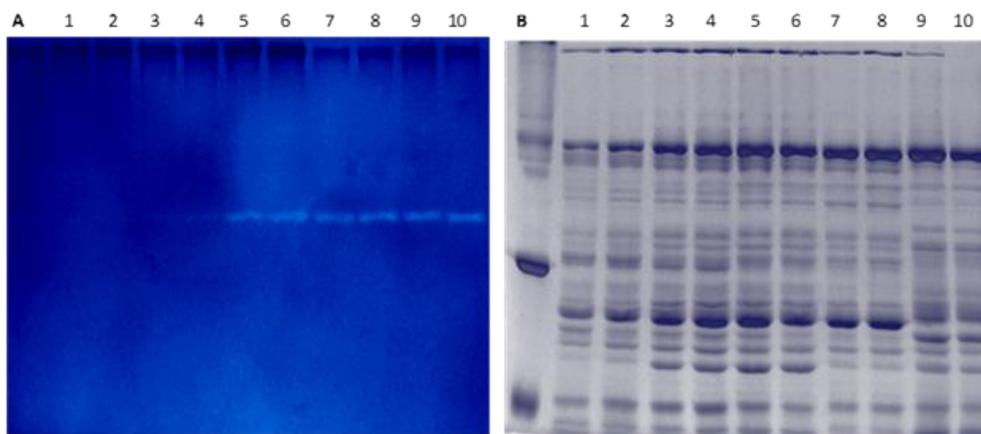


Figura 4.37. Zimograma (A) y SDS-PAGE (B) 20 μ g de los extractos proteicos de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio CR20 a pH 4 (líneas 1-2), pH 5 (líneas 3-4), pH 6 (5-6), pH7 (7-8) y medio General pH 6 (9-10).

Los resultados de este análisis revelaron la presencia de una enzima lítica activa en *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General. Esta enzima se detectó también en las muestras obtenidas en medio CR20, pero principalmente cuando el pH del medio extracelular fue 6 o superior. Además, la intensidad de la banda activa fue proporcional al pH del medio de cultivo.

4.8.2. Análisis genético de *Lactobacillus reuteri* CECT 8605

La adquisición de la capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol que exhibe *L. reuteri* CECT 8605 al ser cultivado a pH 6, requiere que el microorganismo se encuentre en crecimiento o, al menos, metabólicamente activo (Figura 4.31), lo que podría indicar que este fenómeno esté regulado por algún factor genético. Para tratar de localizar estos factores genéticos, se decidió identificar aquellos genes que se expresan en mayor grado en condiciones de cultivo a pH 6 frente a pH 5. Para ello, se realizó un experimento de hibridación substractiva utilizando ARN total de la cepa *L. reuteri* CECT 8605 cultivada en medio General pH 6 como muestra *tester* y ARN total aislado de la misma cepa cultivada en medio CR20 pH5 como *driver* (ver apartado 3.11 de “Materiales y Métodos”).

El resultado de este experimento fue una colección de plásmidos con insertos correspondientes a fragmentos de ADNc de genes sobreexpresados en la muestra *tester* (*L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6). Se analizaron 370 plásmidos, descartando aquellos que presentaban el mismo inserto mediante hibridación por *Dot-Plot* o *Southern* (ver apartado 3.17 de "Materiales y métodos), secuenciando (Sistemas Genómicos, S.L.) finalmente 38 fragmentos. Las secuencias obtenidas se analizaron informáticamente buscando similitud con secuencias nucleotídicas depositadas en la base de datos del NCBI. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.6, en la que se ha incluido el identificador y posición en el genoma de la cepa bacteriana con mayor similitud.

Para confirmar la validez de los resultados obtenidos en el experimento de hibridación substractiva, seleccionamos una serie de genes para analizar su nivel de expresión en *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 y en medio CR20 pH 5 (Figura 4.38). La cuantificación por PCR a partir de ARN purificado en las condiciones descritas de la expresión de estos genes, reveló que efectivamente dichos genes mostraban una mayor expresión (superior a 10 veces) en medio General que en medio CR20.

La identidad de los genes que se expresan en mayor grado en medio General pH 6, frente a medio CR20 pH 5, no arrojó información clara sobre los elementos genéticos que pueden determinar las diferencias observadas en *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en dichos medios. Además de secuencias con función desconocida en otros microorganismos, se aislaron secuencias de genes que codifican proteínas de membrana y transportadores. La modificación de la expresión de estos genes puede deberse a la adaptación a una menor concentración de protones extracelular, sin estar implicada en las alteraciones observadas en la envoltura bacteriana de *L. reuteri* CECT 8605. Llama la atención la detección de genes ribosomales (ARN ribosómico y secuencias de proteínas ribosomales) con un mayor grado de expresión en medio General pH 6 frente a medio CR20 pH 5. No se descarta que estos resultados sean un artefacto ocasionado por el empleo de ARN total en vez de ARN mensajero en los experimentos de hibridación substractiva.

Tabla 4.6. Secuencias obtenidas tras un análisis informático con la base de datos del NCBI, donde se comparan con el genoma de *L. reuteri* I5007 CP006011.

Tipo de gen	Plásmido	Inserto (pb)	Locus	Posición en el genoma
Integrasas y/o transposasas	pASO7	149	LRI_0048 ^A	48014-48162
	pASO20	99	LRI_0044	44816-44718
	pASO31	157	LRI_1003 ^B	1017355-1017511
	pASO33	95	LRI_1764 ^D	1814643-1814737
	pASO39	131	LRI_0567	573152-573282
	pASO51	398	LRI_248 ^C	255777-256174
	pASO55	82	LRI_0946	966370-966451
	pASO77 [#]	130	LRI_1764	1814613-1814732
	pASO331	131	LRI_0142	145991-146121
	pASO348	181	LRI_0946	966328-966508
Transportadores de membrana	pASO70	119	LRI_0205 ^F	208582-208700
	pASO370 [#]	195	LRI_1674 ^E	1719920-1719951
Síntesis de ácidos nucleicos	pASO258	118	LRI_1387	1411262-1411379
	pASO299	253	LRI_1812	1866916-1867144
			LRI_1612	1651645-1651673
	pASO312 [#]	272	LRI_0744	756077-756183
	pASO275 [¥]	172	LRI_1820	189897-190060
	pASO338	118	LRI_1091	1111254-1111371
	pASO343 [#]	174	LRI_1832	1889025-1889177
pASO367	263	HMPREF053 8_20521	517389-517649*	
Sin función	pASO49 [#]	253	LRI_1348	1368763-1368875
ARN ribosómico	pASO79	166	LRI_r0002	662621-662786
	pASO328	115	LRI_1224	1249828-1249942
Metabolismo aa ⁺	pASO62	121	LRI_0289	295432-295552

#La similitud no pertenece al fragmento entero, pero sí a más del 60 % de pares de bases. ¥Similitud inferior al 98 %. *Posición en el genoma de *Lactobacillus reuteri* SD2112, código de acceso CP002844. ⁺Metabolismo de aminoácidos. Secuencia empleada para el diseño de oligonucleótidos empleados en los análisis de expresión génica de los genes ^AIntegrasa, ^BTransposasa A, ^CTransposasa B, ^DTransposasa C, ^ETransportador ABC y ^FTransportador Na/H⁺ en las gráficas 4.38, y 4.40.

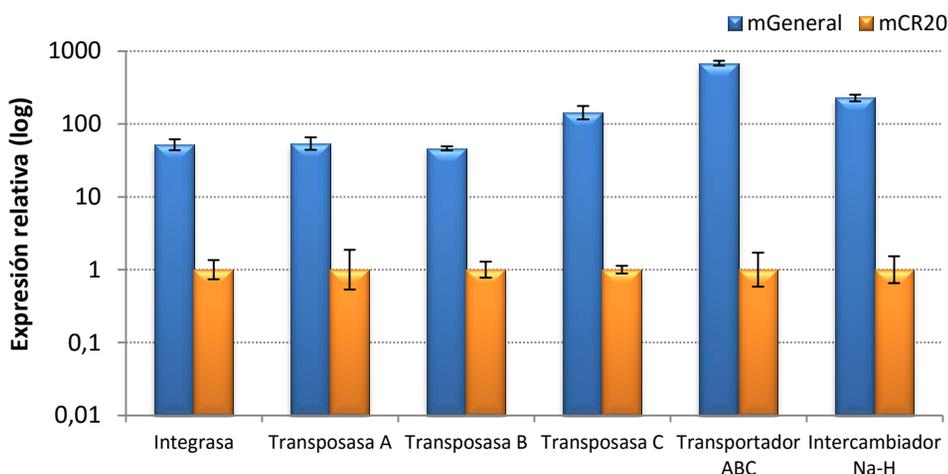


Figura 4.38. Datos de expresión génica relativa de algunos de los genes detectados mediante hibridación substractiva en *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH6 (azul) y en medio CR20 pH5 (naranja), empleando el gen GAPDH como gen control.

Por otro lado, el grupo de genes que mayor número de resultados ha generado ha sido el conjunto de genes relacionados con integrasas y/o recombinasas, asociados a transposones o bacteriófagos, así como genes relacionados con la replicación de ADN y síntesis de bases nitrogenadas. El incremento de expresión de estos genes, así como la inducción de una enzima lítica, la baja viabilidad de los cultivos y la alteración de la envoltura bacteriana que experimenta *L. reuteri* CECT 8605 al ser cultivado en medio General pH 6, parece apuntar a que la activación de secuencias de profagos podría ser responsable de los hechos descritos.

Siguiendo esta hipótesis, nos sorprendió en cierta medida no detectar ningún gen que codificara enzimas líticas (autolisinas o endolisinas) con mayor expresión en medio General. Apoyados por el hecho de haber identificado una de estas enzimas mediante zimogramas, con actividad condicionada por el pH extracelular (ver apartado 4.8.1), diseñamos oligonucleótidos homólogos a las secuencias de dos genes de enzimas líticas de *L. reuteri* depositadas en la base de datos del NCBI (Tabla 4.7). Una amplificación a partir de ADN genómico confirmó la presencia de uno de los genes (LAR1322) en *L. reuteri* CECT 8605. El análisis de expresión de este gen, determinado

mediante qPCR en bacterias cultivadas en medio General y en medio CR20, reveló, de nuevo, una mayor expresión en medio General (Figura 4.39).

Tabla 4.7. Autolisinas y holinas encontradas en la base de datos del NCBI

Locus	Descripción	Localización
LAR 1322	Autolisina (<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112)	AP007281.1 (1499136 – 1500059)
LAR 1284	Autolisina (<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112)	AP007281.1 (1462930 – 1464528)
LRATCC53608_pi024	Holina I (<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 53608)	LN906635.1 (24680 – 24949)
Lreu_0858	Holin II (<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016)	CP000705.1 (910618 – 911067)

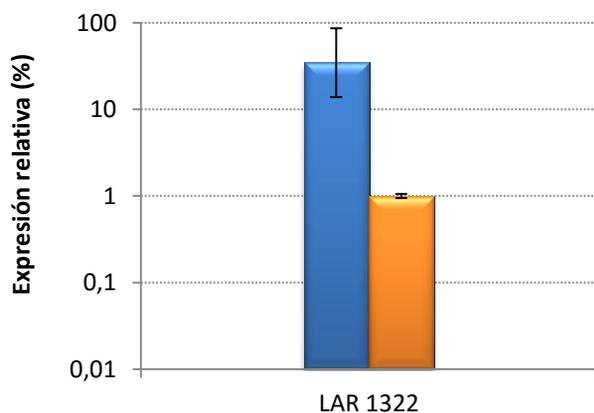


Figura 4.39. Datos de expresión génica relativa del gen de la enzima lítica LAR 1322 en *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 (azul) y medio CR20 pH 5 (naranja).

La autolisina mencionada anteriormente puede ser producida por un bacteriófago. Los fagos producen endolisinas que pueden ser translocadas a la pared celular bacteriana mediante unas proteínas de membrana denominadas holinas, por el sistema holina-lisina (Young, 2014). Por lo que, de igual forma que en el caso de las enzimas líticas, se diseñaron 2 parejas de *primers*, a partir de secuencias de *L. reuteri* depositadas en las base de datos del NCBI, de 2 genes de holinas y se analizó, mediante PCR si la cepa *L. reuteri* CECT 8605 poseía estos genes en su genoma. En este caso, la amplificación producida a partir de ADN genómico de *L. reuteri* CECT 8605 no permitió confirmar la presencia de estos genes en nuestra cepa.

4.8.3. Detección de bacteriófagos en *Lactobacillus reuteri* CECT 8605

Como hemos visto anteriormente, varios resultados obtenidos en nuestros experimentos parecen apuntar a la existencia de algún profago funcional en *L. reuteri* CECT 8605, que en cierta medida sea susceptible de ser activado por el cambio de pH del medio de cultivo. Por ese motivo, se llevaron a cabo varios ensayos para tratar de detectar elementos víricos. Por una parte, se trató de inducir la fase lítica fágica incubando *L. reuteri* CECT 8605 con mitomicina C en medio General pH 6. Sin embargo, no se obtuvieron variaciones significativas en la densidad óptica a 600 nm del cultivo, tras 7 h de incubación (resultados no mostrados).

Por otro lado, realizamos ensayos de infección en medio sólido, para tratar de detectar placas de lisis, empleando sobrenadantes de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 como agente vírico y *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio CR20 pH 5 y *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 como receptores de la infección. Sin embargo, tras varios ensayos, no se observó aparición de placas de lisis en ninguna de las condiciones.

Por último, empleando sobrenadante de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General y sobrenadante de *E. coli* LE 392 infectada con el fago λ como control positivo, se intentó aislar ADN vírico. Únicamente obtuvimos resultados positivos en el caso del control positivo. Las muestras obtenidas del cultivo de *L. reuteri* CECT 8605 no presentaron material genético ni al analizarse mediante electroforesis en geles de agarosa ni al tratar de amplificar mediante qPCR posibles secuencias víricas (transposasas/integrasas detectadas en el experimento de hibridación substractiva y autolisina LAR 1322; resultados no mostrados).

4.8.4. Especificidad de la expresión génica en función del pH en cepas de *L. reuteri*

A fin de comprobar si los cambios producidos a nivel genético en *L. reuteri* CECT 8605 por la variación de pH son específicos de cepa, se analizó la expresión génica de algunos de los genes detectados, según los resultados de la hibridación substractiva, en distintas cepas de *L. reuteri* cultivadas en medio CR20 pH5 y medio General pH 6 (Figura 4.40). Los resultados obtenidos mostraron diferencias en la expresión de algunos de los genes estudiados, dependiendo de las condiciones de cultivo, en las cepas de *L. reuteri* analizadas. Sin embargo, no observamos una réplica del patrón de expresión génica detectado en *L. reuteri* CECT 8605 mediante hibridación substractiva y comprobado mediante PCR cuantitativa.

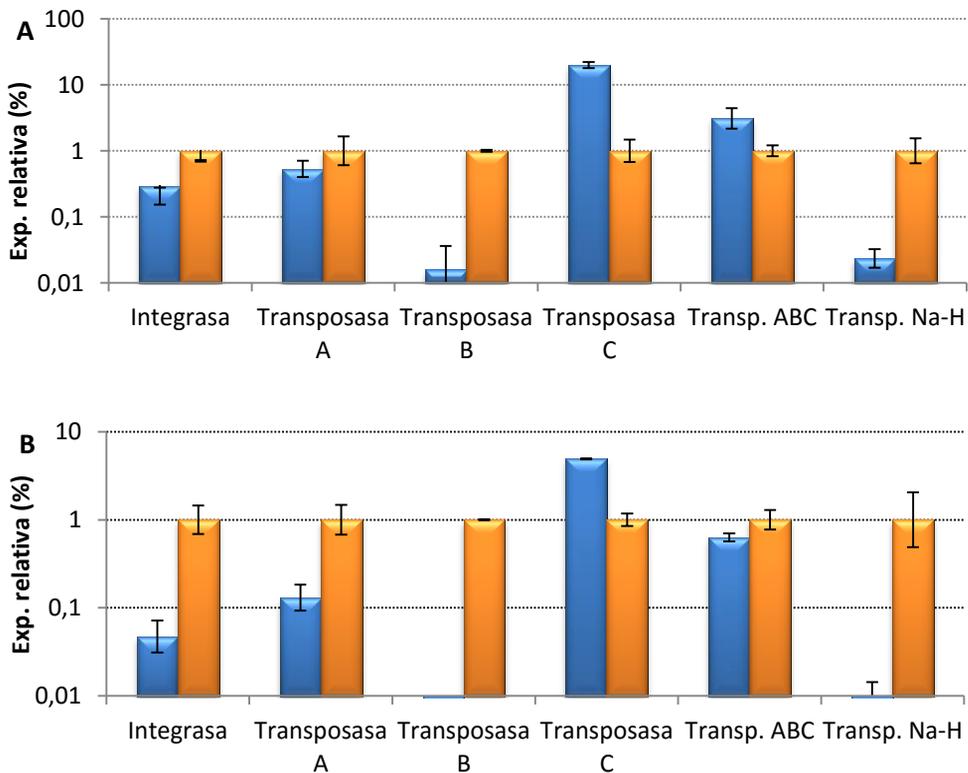


Figura 4.40. Datos de expresión génica relativa de distintos genes en medio General pH 6 (azul) y medio CR20 pH5 (naranja) en las cepas: (A) *L. reuteri* CECT 7266 y (B) *L. reuteri* CECT 925.

Al igual que con la cepa *L. reuteri* CECT 8605, se analizó también si alguna de las cepas *L. reuteri* de las que disponemos en nuestro laboratorio poseen en su genoma genes relacionados con la expresión de genes que codifican para enzimas autolisinas u holinas (Tabla 4.8)

Tabla 4.8. Detección mediante PCR de secuencias codificantes para autolisinas y holinas en distintas cepas de *L. reuteri*.

Cepa	Autolisina LAR 1322	Holin I	Holin II
<i>L. reuteri</i> CECT 8605	+	-	-
<i>L. reuteri</i> BT 836	-	-	-
<i>L. reuteri</i> CECT 7260	+	-	-
<i>L. reuteri</i> CECT 7266	+	-	-
<i>L. reuteri</i> CECT 925	+	-	-

Los resultados de estos ensayos revelaron la presencia de la autolisina LAR 1322 en el genoma de 3 de las cepas de *L. reuteri* analizadas. Por esta razón, decidimos realizar un zimograma en condiciones semi-nativas a fin de comprobar la existencia o no de tal actividad enzimática, al igual que ya se hizo previamente con la cepa *L. reuteri* CECT 8605 (ver apartado 4.8.1), cultivando las cepas descritas en la tabla 4.8 bajo 2 condiciones de crecimiento: medio General pH 6 y medio CR20 pH 5 (Figura 4.41).

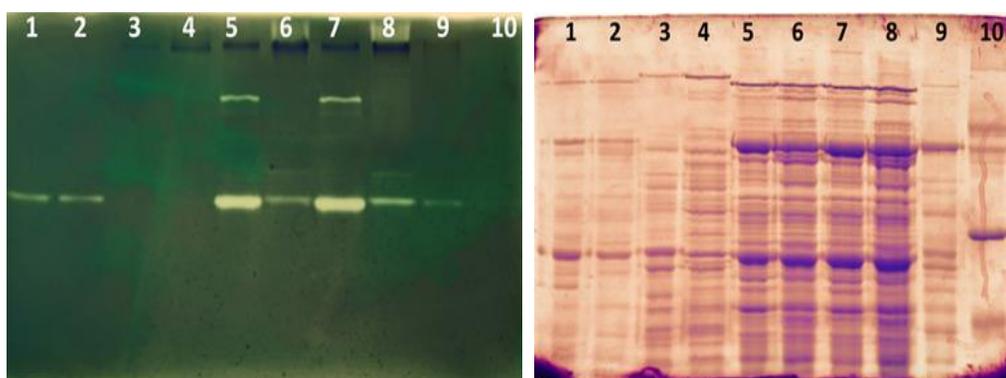


Figura 4.41. Zimograma (A) y SDS-PAGE (B) realizados con 10 μ g de los extractos proteicos de (1,2) *L. reuteri* CECT 7260; (3,4) *L. reuteri* BT 836; (5,6) *L. reuteri* CECT 925; (7,8) *L. reuteri* CECT 7266; (9) *L. reuteri* CECT 8605; (10) Marcador de peso molecular. (2,4,6,8,9) Medio General pH 6; (1,3,5,7) Medio CR20 pH5.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados para detectar el gen de la autolisina LAR 1322, y los datos observados en los zimogramas de actividad lítica, indicaban que las cepas *L. reuteri* CECT 925, 7260 y 7266 poseen dicho gen; y que las cepas CECT 925 y 7266 muestran una enzima lítica más activa al ser cultivadas en medio General pH 6 frente a medio CR20 pH 5, al igual que lo observado en *L. reuteri* CECT 8605. Con estos precedentes, quisimos comprobar si la expresión del gen LAR 1322 en ambos medios podía correlacionarse con la actividad enzimática detectada en los zimogramas. El análisis realizado mediante qPCR, a partir de ARN aislado de ambas cepas cultivadas en medio General y medio CR20 (Figura 4.42), mostró que el gen estudiado sí se sobreexpresaba en medio General en la cepa CECT 7266, tal y como ocurre en *L. reuteri* CECT 8605, pero reveló que dicho gen exhibía un grado de expresión similar en las dos condiciones estudiadas en *L. reuteri* CECT 925. Estos resultados arrojan cierta incertidumbre sobre la posibilidad de que la enzima lítica identificada en los distintos zimogramas esté codificada por el gen LAR 1322, en las 4 cepas de *L. reuteri* en las que hemos detectado dicha enzima y comprobado la presencia del gen estudiado.

La cepa *L. reuteri* CECT 7266 presenta características moleculares similares a *L. reuteri* CECT 8605: sobreexpresión del gen LAR 1322 (Figura 4.42) y una mayor actividad lítica al ser cultivado en medio General pH 6. Sin embargo, *L. reuteri* CECT 7266 no ha demostrado capacidad de reducir la absorción de fluoresterol en los ensayos realizados en enterocitos HT-29 (datos no mostrados), ni presenta una baja concentración de bacterias viables al ser cultivada en medio General. Todo ello parece indicar que la capacidad de absorber fluoresterol de *L. reuteri* CECT 8605, al ser cultivado a pH 6, puede ser condicionada por otros factores distintos a exhibir una mayor actividad autolítica.

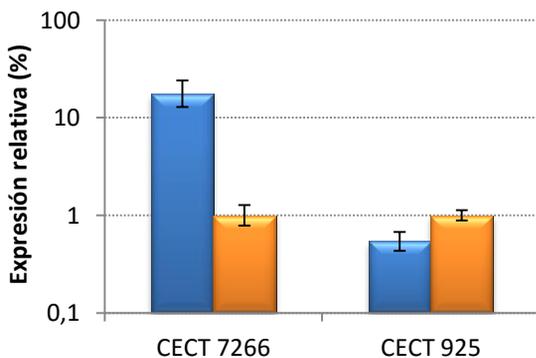


Figura 4.42. Datos de expresión génica relativa (qPCR) del gen *LAR 1322*, en las cepas de *L. reuteri* indicadas cultivadas en medio General pH 6 (azul) y medio CR20 pH5 (naranja) en las cepas que se indican.

4.9. Estudio de la actividad *in vivo* de *Lactobacillus reuteri* CECT 8605 y *Bifidobacterium breve* CECT 8606 en un modelo animal

Las dos cepas bacterianas seleccionadas, *L. reuteri* CECT 8605 y *L. reuteri* CECT 8606, han demostrado sobradamente su capacidad hipocolesterolémica en nuestros ensayos *in vitro*. El mecanismo de acción por el cual reducen la absorción de fluoresterol en enterocitos, de producirse *in vivo* también, podría llevar a reducir la absorción de colesterol dietético o endógeno presente en el tracto digestivo. Por este motivo, se decidió comprobar el efecto de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, vivos e inactivados térmicamente, en un modelo de hipercolesterolemia inducida por la dieta en ratas Wistar hembras. El ensayo se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Julio Gálvez y del Dr. Juan Duarte de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Se emplearon 60 ratas Wistar hembra de un peso aproximado de 200 g, distribuidas en grupos de 10 animales, tal y como se indica en la tabla 4.9. El estado hipercolesterolémico se indujo complementado el pienso estándar con un 1 % (p/p) de colesterol. La dosis de bacterias probióticas se estableció en $2 \cdot 10^9$ bacterias por animal y día, administradas en el agua de bebida. El establecimiento de la hipercolesterolemia se comprobó tomando muestras de sangre cada 7-10 días a fin de determinar los niveles de colesterol en suero. Tras 57 días de estudio, el grupo con dieta hipercolesterolémica (B) mostró diferencias significativas en cuanto al nivel de colesterol en plasma en comparación con el grupo control (A; Figura 4.43). A pesar de ello, prolongamos el ensayo durante un total de 94 días, momento en el que se procedió al sacrificio de los animales, y obtención de muestras de sangre para determinar colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), triglicéridos, fosfolípidos y glucosa.

Tabla 4.9. Distribución de las ratas Wistar y las muestras empleadas en el ensayo *in vivo* de reducción de absorción de colesterol.

Grupo	Nº animales	Dieta	Muestra	Dosis/diaria
A	10	Estándar	-	-
B	10	Estándar + 1% colesterol	-	-
C	10	Estándar + 1% colesterol	<i>L. reuteri</i> CECT 8605	2.10 ⁹ ufc
D	10	Estándar + 1% colesterol	<i>L. reuteri</i> CECT 8605 tratada térmicamente	2.10 ⁹ ufc
E	10	Estándar + 1% colesterol	<i>B. breve</i> CECT 8606	2.10 ⁹ ufc
F	10	Estándar + 1% colesterol	<i>B. breve</i> CECT 8606 tratada térmicamente	2.10 ⁹ ufc

Los resultados obtenidos revelaron que los 4 grupos de animales que consumieron muestras bacterianas presentaron valores de colesterol sérico menores que los del control hipercolesterolémico (grupo B), en el punto medio del ensayo. Esta reducción acercó los valores de los grupos tratados con *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 a los observados en el control sano (grupo A), siendo esta reducción significativa estadísticamente únicamente en el grupo de animales que consumieron *B. breve* CECT 8606 inactivado térmicamente (Figura 4.43.A). En las siguientes cuantificaciones de colesterol total, a los 94 días de ensayo, observamos cómo estas diferencias desaparecían, obteniendo valores de colesterol total sérico similares en todos los grupos animales que consumieron pienso enriquecido en colesterol (Figura 4.43.B).

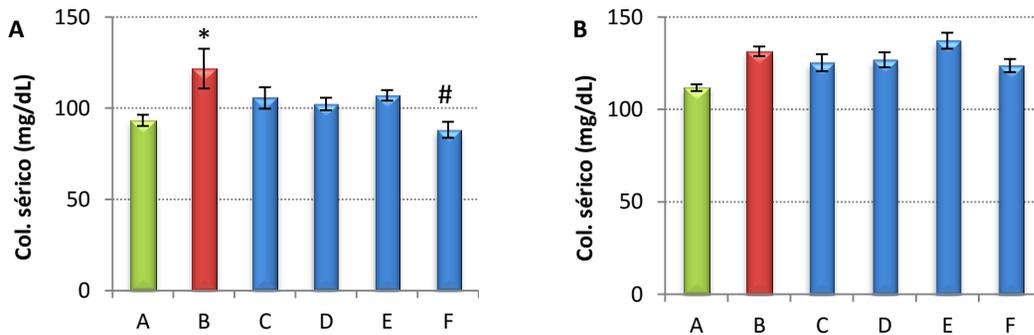


Figura 4.43. Colesterol en suero de los 6 grupos de ratas Wistar tras 57 días (A) y 94 días (B) de estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de los valores obtenidos en cada grupo. Los símbolos señalan los grupos con diferencias significativas según la prueba estadística t-Student con un $\alpha = 0,05$ y $p < 0,5$ respecto al grupo control A (*) o al grupo hipercolesterolémico B (#).

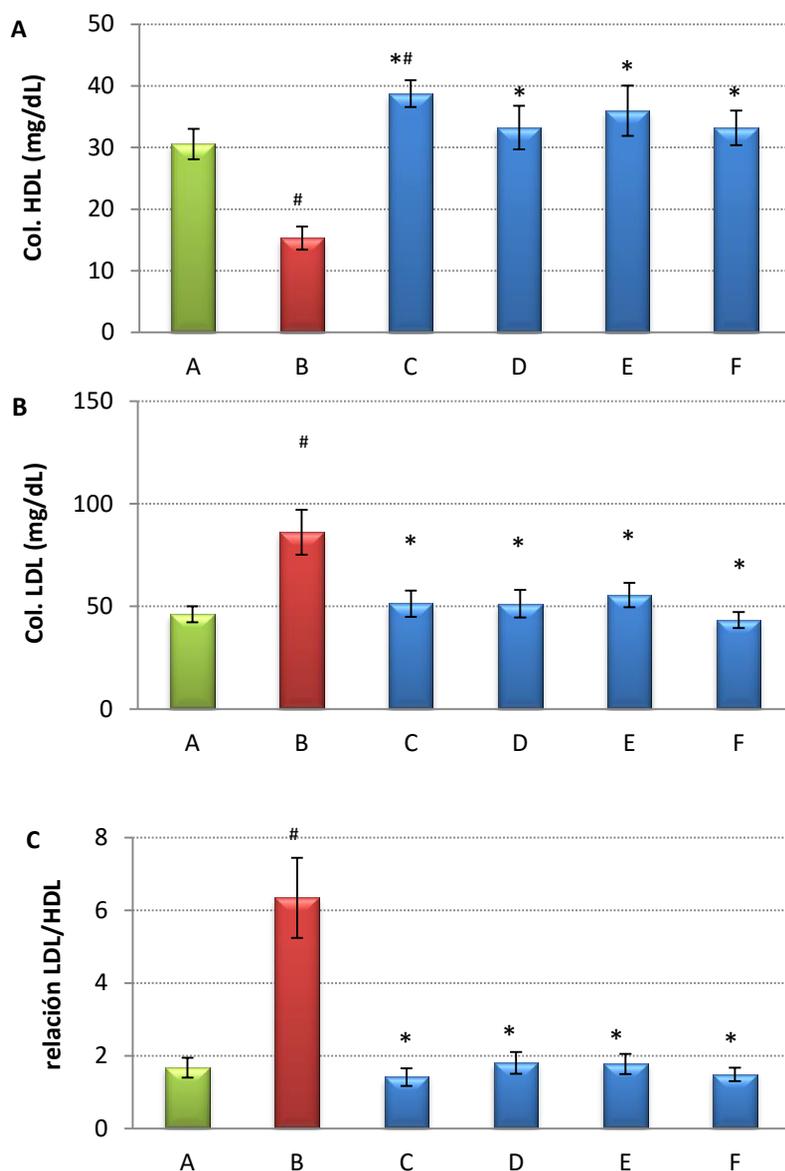


Figura 4.44. Colesterol-HDL (A), colesterol-LDL (B) y relación LDL/HDL (C) medido en los 6 grupos de animales tras 94 días de estudio. Las barras de error muestran el error estándar de la media. El símbolo (#) representa los grupos con diferencias significativas según la prueba estadística t-Student con un $\alpha = 0,05$ y $p < 0,5$ respecto al grupo control (A) y el asterisco (*) con respecto al grupo hipercolesterolémico (B).

Los datos de concentración de HDL determinados en las muestras finales (94 días) de los grupos de animales, que consumieron probióticos (C-F) fueron similares a los del grupo control sano (A), en contraste con el grupo control hipercolesterolémico (B), donde los niveles de HDL fueron más bajos (Figura 4.44.A). El perfil inverso, valores similares en el grupo sano y los grupos tratados con bacterias, pero una concentración significativamente más elevada en el grupo hipercolesterolémico, se observó al analizar los datos de LDL en suero. En ambos casos, las diferencias fueron estadísticamente significativas. Los valores de concentración de HDL y LDL obtenidos determinaron que el índice LDL/HDL en los animales que consumieron las muestras bacterianas fueron similares a los del grupo sano, muy por debajo del índice LDL/HDL calculado para los animales del grupo control hipercolesterolémico (Figura 4.44.C).

En cuanto al análisis de otros parámetros, tales como la concentración de glucosa en sangre, reveló un incremento en el grupo hipercolesterolémico (grupo B) frente al grupo control (grupo A), posiblemente debido a un proceso de resistencia a insulina asociado generalmente a hipercolesterolemia y bajos niveles de colesterol HDL. Los 4 grupos de animales que consumieron probióticos mostraron un descenso en los niveles de glucemia hasta valores similares a los del control sano (Figura 4.45).

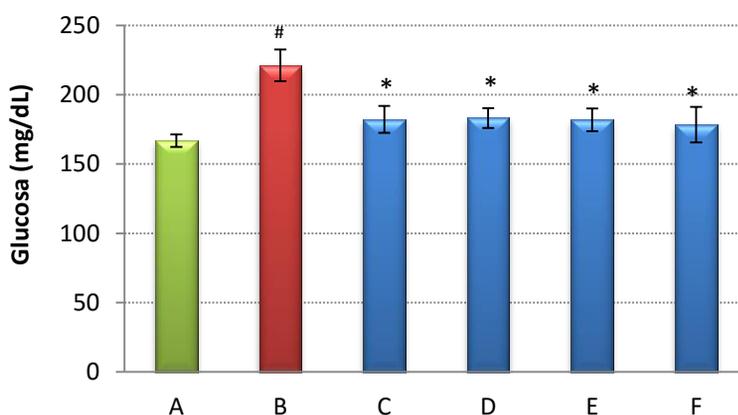


Figura 4.45. Glucemia media en los 6 grupos de animales, a los 94 días de inicio del ensayo. Las barras de error representan el error estándar de la media. Se señalan aquellos grupos que presentan diferencias significativas (t-Student $\alpha=0,05$ y $p<0,5$): #Respecto al control sano (A); *Respecto al control hipercolesterolémico (B).

Otro parámetro estudiado fue la concentración de triglicéridos en plasma. En este caso, de nuevo, observamos un incremento en el grupo hipercolesterolémico (grupo B) frente al control sano, y un descenso a valores cercanos a los del grupo control sano (grupo A) en los animales que consumieron las suspensiones bacterianas. Sin embargo, las diferencias que observamos no fueron significativas estadísticamente (Figura 4.46A). No observamos diferencias entre los 6 grupos de animales de experimentación en cuanto a la concentración de fosfolípidos en plasma (Figura 4.46B).

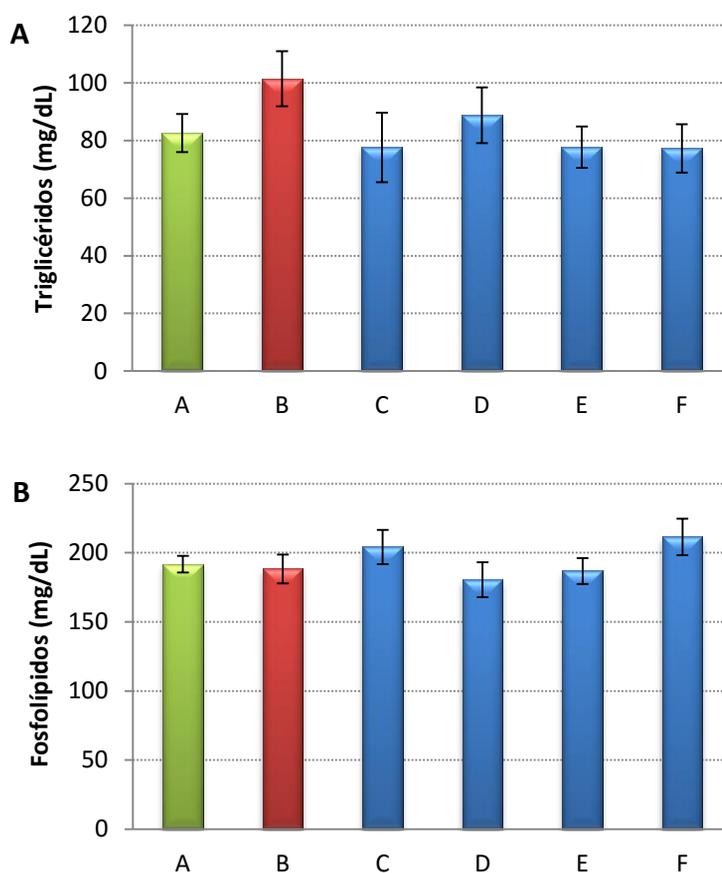


Figura 4.46. Concentración de triglicéridos (A) y fosfolípidos (B) media en los 6 grupos de animales, a los 94 días de inicio del ensayo. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Capítulo 5. Discusión

El colesterol es un compuesto esencial para el normal desarrollo de diversas funciones fisiológicas y celulares, en el ser humano y otros organismos. Sin embargo, ciertas alteraciones genéticas, malos hábitos alimenticios y/o un estilo de vida sedentario han ocasionado que parte de la población de países industrializados y en vías de desarrollo, presente una concentración de colesterol en sangre elevada, asociada generalmente a enfermedades cardiovasculares graves (Goff et al., 2006; Maxfield y van Meer, 2010; Seo y Choi, 2015). En este sentido, algunos estudios han mostrado un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico plasmático, asociado al consumo de algunas especies probióticas (Tablas 1.6 y 1.7). Los resultados de distintos ensayos, *in vitro* e *in vivo*, contrastan con el hecho de que, hasta la fecha, no hay ningún producto probiótico con alegaciones sobre salud cardiovascular aprobadas por la EFSA (Binnendijk y Rijkers, 2013). De igual forma, los resultados de diversos ensayos clínicos que han sido llevados a cabo por distintos grupos de investigación no han sido todo lo concluyentes que podría desearse (Lewis y Burmeister, 2005; Simons et al., 2006). Aun así, siguen existiendo evidencias que apuntan a que el consumo de especies probióticas puede ayudar a mejorar algunos parámetros del perfil lipídico asociado a estados hipercolesterolemicos. Estas evidencias, junto a otras características positivas reconocidas en bacterias probióticas (pocos efectos secundarios adversos, productos generalmente asequibles económicamente, considerados ingredientes alimentarios...), hicieron que nos planteáramos analizar el efecto de 28 cepas bacterianas y diversos derivados de ellas (Tablas 3.11 y 3.12), con el objeto de buscar actividades biológicas con aplicación en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Dado que uno de los hábitats naturales de las especies que componen nuestra colección de muestras es el tracto intestinal, decidimos estudiar el efecto de dichas muestras sobre la etapa luminal de la absorción de colesterol. Por ello, comprobamos cómo las cepas bacterianas y sus derivados afectaban a la actividad de la enzima colesterol esterasa, la hidrólisis de sales biliares y la absorción de colesterol por enterocitos.

5.1. Inhibición de la enzima colesterol esterasa

La enzima colesterol esterasa pancreática cataliza la hidrólisis de los ésteres de colesterol en el intestino delgado, y su inhibición limita la biodisponibilidad del colesterol procedente de la dieta. Además, existen indicios de que esta enzima también facilita la absorción de colesterol mediante la hidrólisis de la fosfatidilcolina, mejorando la transferencia del colesterol desde las micelas al interior del enterocito (Hamada et al., 2005).

Los ensayos realizados para testar si alguna de las muestras de la colección era capaz de inhibir la enzima colesterol esterasa no revelaron ningún resultado positivo. Los inhibidores de la enzima colesterol esterasa descritos en la literatura científica actúan interaccionando con su centro catalítico (Ser-His-Asp) y suelen ser compuestos sintéticos derivados de polifenoles (Wei et al., 2014) o compuestos orgánicos heterocíclicos (Heng et al., 2011). Podemos suponer que ninguna de las muestras bacterianas, ni las estructuras subcelulares, ni los metabolitos producidos o extraídos de ellas exhiben capacidad de reducir la actividad de esta enzima, quizá por no poder acceder al centro catalítico descrito.

La enzima colesterol esterasa es capaz de hidrolizar no solo ésteres de colesterol, sino también ésteres de vitaminas y triglicéridos (Quistad et al., 2006), y algunos inhibidores de la lipasa pancreática parecen inhibir también a la enzima colesterol esterasa, como es el caso del orlistat (Guerciolini, 1997). Algunas muestras de nuestra colección han exhibido capacidad de inhibir la enzima lipasa pancreática en estudios previos (Sañudo et al., 2016). Las diferencias entre ambas enzimas o el mecanismo de inhibición de las muestras positivas frente a la lipasa pancreática, pueden ser la razón por la cual dichas muestras no ejerzan efecto sobre la colesterol esterasa, hecho que se ha observado en otros inhibidores de la lipasa pancreática (Adisakwattana et al., 2012).

5.2. Hidrólisis de sales biliares

La actividad hidrolasa de sales biliares (HSB) que poseen algunas bacterias intestinales y ciertas cepas probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, es el mecanismo por el cual se ha tratado de explicar el efecto de dichos probióticos sobre el metabolismo del colesterol y otros parámetros lipídicos, en estudios *in vitro* e *in vivo* (Liong y Shah, 2005; Ooi y Liong, 2010; Tsai et al., 2014).

La presencia de actividad hidrolasa de sales biliares en bacterias entéricas se ha postulado como uno de los posibles mecanismos que permitiría a estos organismos sobrevivir en presencia de sales biliares, las cuales pueden alterar la estructura de la envoltura bacteriana, reduciendo la viabilidad celular. La tolerancia a sales biliares, independientemente del mecanismo subyacente (Alcántara y Zúñiga, 2012; Ruiz et al., 2011) es un criterio clave para la selección de bacterias probióticas (Presti et al., 2015) que fue evaluado, en estudios previos, en las 28 cepas que componen la colección de muestras. Por lo tanto, no era descartable que alguna de las mencionadas cepas exhibiera actividad hidrolasa de sales biliares.

Tras analizar dicha actividad, únicamente en la fracción de muestras de la colección correspondiente a las cepas vivas, puesto que los distintos tratamientos podrían haber inactivado la dotación enzimática bacteriana, 4 cepas bacterianas de las 28 que se testaron mostraron cierta actividad HSB: *L. reuteri* CECT 8605, *L. rhamnosus* BT 585, *Lc. lactis* BT 575 y *B. breve* CECT 8606. Sin embargo, dicha actividad fue significativamente inferior a la observada en la cepa de *L. plantarum* seleccionada como control positivo del ensayo (Figura 4.3). El nivel de actividad hidrolasa de sales biliares de algunos microorganismos puede ser modificado por factores externos, promoviendo los mecanismos de protección de la bacteria e incrementando, en condiciones de crecimiento adecuadas, dicha actividad enzimática (Grill et al., 2000; Lundeen y Savage, 1990; Pereira et al., 2003). La necesidad de profundizar más en otros resultados presentados en esta memoria hizo que descartáramos temporalmente esta línea de trabajo.

5.3. Validación del método experimental

El estudio de la absorción de colesterol en modelos *in vitro* implica la cuantificación intracelular de esta molécula. Los ensayos bioquímicos colorimétricos o cromatográficos (Palmgrén et al., 2005; Qin et al., 2014) pueden ser suficientemente exactos y reproducibles, pero requieren la preparación de extractos libres de células, que hace que no sean adecuados para programas de búsqueda de actividades biológicas en colecciones de un elevado número de muestras. El empleo de moléculas de colesterol marcadas radiactivamente solventa este inconveniente (Feng et al., 2010; Nekohashi et al., 2014) pero tiene desventajas ampliamente conocidas. Como alternativa, los análogos estructurales fluorescentes del colesterol aportan las ventajas del marcaje radiactivo (facilidad de cuantificación) y de los métodos bioquímicos (más seguros y menos contaminantes, generalmente). Existen varios análogos fluorescentes del colesterol (Gimpl y Gehrig-Burger, 2007), entre los cuales seleccionamos como molécula testigo el fluoresterol, debido a que ha demostrado analogía funcional al colesterol en modelos *in vitro* e *in vivo*. Este compuesto, es absorbido por el epitelio intestinal, esterificado y localizado en plasma de hámsteres alimentados con dicha molécula. Además, dicha absorción puede ser bloqueada por compuestos que también inhiben la absorción de colesterol (Sparrow et al., 1999).

La administración de fluoresterol a cultivos celulares de HT-29 en nuestros ensayos, empleando micelas como vehículo de transporte con ligeras modificaciones de los métodos empleados por Kirana y Sparrow (Kirana et al., 2005; Sparrow et al., 1999) tuvo como resultado su incorporación (cuantificada mediante fluorocitometría) y distribución intracelular (detectada mediante microscopía), tal y como se ha demostrado en otros estudios (Kheirloomoom y Ferrara, 2007). Además, la fluorescencia intracelular en enterocitos HT-29 incrementa su intensidad con el tiempo de incubación con micelas de fluoresterol, lo que sugiere que la internalización del fluoresterol en el enterocito es unidireccional (Figura 4.11), simulando en cierta medida las características de la absorción de colesterol por enterocitos *in vivo*. Nuestro modelo demostró, además, una relación lineal entre la concentración extracelular de fluoresterol y la absorción de esta molécula (Figura 4.9), lo que minimiza obtener resultados falsos

negativos por saturación del sistema con la molécula testigo, y facilita detectar efectos inhibitorios de menor magnitud.

El análisis del efecto de compuestos con capacidad de inhibir la absorción de colesterol en nuestro modelo *in vitro* arrojó distintos resultados para los diferentes compuestos estudiados. Los galato de epigallocatequinas (EGCG) disminuyen la solubilidad del colesterol al interactuar con la fosfatidilcolina que compone las micelas (Kobayashi et al., 2014; Wang et al., 2006). A pesar de que hay estudios en los que con una hora de incubación entre micelas de colesterol y EGCG, se observa un descenso en la concentración de colesterol en las micelas de hasta un 65 % (Raederstorff et al., 2003), en nuestras condiciones de ensayo, añadiendo las micelas de fluoresterol a cultivos celulares que ya contenían EGCG, no observamos una reducción significativa en la absorción de fluoresterol por los enterocitos HT-29 (Figura 4.14). Puede que la cinética de absorción de fluoresterol de nuestro modelo impida detectar el efecto del EGCG. Una incubación previa entre el EGCG y las micelas de fluoresterol, antes de añadir estas a los cultivos celulares, quizá nos hubiese permitido observar una reducción en la absorción de fluoresterol. Este puede haber sido el caso de los datos obtenidos en los ensayos con β -sitosterol, en el que comprobamos que el efecto inhibitorio de este compuesto parece deberse a su competencia con el fluoresterol en la etapa de formación de las micelas (Figura 4.15), ya que por el contrario, la adición de β -sitosterol y fluoresterol en micelas distintas no afectó a la absorción de fluoresterol en nuestros ensayos con enterocitos HT-29. La inhibición de la incorporación de colesterol a micelas por el β -sitosterol es un hecho ya descrito (Ikeda y Sugano, 1983) y explicado por la competencia entre las dos moléculas por solubilizarse en las micelas (Melnikov et al., 2004). Por ello, el resultado sería una menor concentración extracelular de fluoresterol disponible para ser absorbido, que da lugar por tanto a una menor fluorescencia intracelular en los cultivos de enterocitos. De igual forma, la reducción de fluoresterol micelar disponible para ser absorbido, debido a la hidrólisis de las sales biliares que forman las micelas, también quedó reflejada como una menor fluorescencia intracelular en los enterocitos HT-29 empleados en nuestros ensayos llevados a cabo con la cepa de *L. plantarum* con actividad hidrolasa de sales biliares (Figura 4.16).

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos con inhibidores de la absorción de colesterol, citados hasta ahora, demuestran que el método experimental utilizado es válido para detectar compuestos que reducen la solubilidad micelar del fluoresterol. La comprobación de la eficacia de dicho método para detectar inhibidores que actúen directamente sobre el transporte de colesterol a través de la membrana de los enterocitos, se llevó a cabo con el medicamento ezetimiba. Este producto inhibe de manera selectiva la absorción del colesterol en el intestino, a través de la proteína NPC1L1, sin afectar a la síntesis de colesterol ni a la excreción de sales biliares (Patel et al., 2003). Para este experimento, ensayamos concentraciones y métodos de administración descritos en bibliografía (Field et al., 2007; Kramer et al., 2005; Yamanashi et al., 2006) observando una inhibición de la absorción de fluoresterol por enterocitos HT-29 del 30 % (Figura 4.12). Otros autores han observado valores de inhibición de la absorción de entre el 50 y el 60 % (Feng et al., 2010; Yamanashi et al., 2006). Diferencias en los métodos de solubilización y administración del inhibidor, o incluso una mayor absorción de fluoresterol en los enterocitos HT-29 por vías independientes de NPC1L1 (Adams et al., 2011) pueden ser la razón por la cual observamos una inhibición de la absorción menor en nuestros experimentos. No obstante, los resultados obtenidos con los distintos inhibidores de la absorción de colesterol, globalmente, junto con los datos previos obtenidos durante la puesta a punto del ensayo, respaldan la capacidad del modelo *in vitro* de absorción de colesterol empleado en nuestros ensayos para detectar agentes con capacidad de reducir la absorción de dicho compuesto.

5.4. Búsqueda de cepas probióticas y derivados con capacidad de inhibir la absorción de colesterol

El resultado de la búsqueda de inhibidores de la absorción de fluoresterol fue la identificación de 9 muestras obtenidas a partir de 6 cepas bacterianas distintas, con capacidad de reducir, de manera significativa estadísticamente, la absorción de fluoresterol en más de un 30 % (Tabla 4.1). Esta capacidad no parece residir especialmente en alguna especie en concreto, ya que las 6 cepas seleccionadas

pertenecen a 5 especies distintas, por lo que puede ser considerada una característica específica de cepa, de forma similar a otras propiedades exhibidas por las muestras de nuestra colección (Sañudo et al., 2016). Uno de los focos de diferenciación bioquímica que parece ser responsable de la heterogeneidad funcional observada entre cepas de la misma especie, se ha identificado como modificaciones de elementos de la envoltura celular (Bron et al., 2013; Lee et al., 2013). No parece desacertado suponer, por tanto, que algunas características específicas de la envoltura de las cepas positivas identificadas sean las responsables de su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol (p.e. mayor permeabilidad o afinidad hacia el fluoresterol o las micelas, mayor capacidad de adhesión o interacción con enterocitos...).

Tres de las cepas con capacidad inhibitoria: *L. casei* BT 838, *L. plantarum* BT 595 y *L. reuteri* CECT 8605 exhiben esta capacidad en forma de células viables. Excepto en el caso de *L. reuteri* CECT 8605, las muestras obtenidas con distintos tratamientos de inactivación a partir de células de las cepas mencionadas, no muestran la misma capacidad inhibitoria. Estos resultados parecen indicar que la actividad identificada está asociada a alguna característica inherente que requiere un estado metabólicamente activo, o a alguna estructura celular que no es capaz de mantener su funcionalidad tras los distintos tratamientos. Por el contrario, *L. reuteri* CECT 8605 inhibe la absorción de fluoresterol al ser analizado en forma de células viables e inactivadas por tres tratamientos distintos: inactivación térmica, por microondas y por incubación con ácido. En este caso, las características que permiten a *L. reuteri* CECT 8605 reducir la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos, parecen ser estructurales y/o bioquímicas que, aunque se encuentran presentes en células viables, no requieren de un estado metabólico activo. Como hemos comprobado en nuestros ensayos, dichas características se mantienen estables tras procesos (incubación a altas temperaturas o en presencia de ácidos concentrados fuertes) que generalmente provocan la desnaturalización y/o inactivación de una gran proporción de estructuras celulares.

Por otro lado, el resultado de nuestra búsqueda de inhibidores de la absorción de fluoresterol nos ha permitido seleccionar tres microorganismos que presentan esta actividad únicamente tras haber sido sometidos a un proceso de inactivación: *B. breve* CECT 8606 y *L. fermentum* BT 584 inactivados térmicamente y *L. casei* BT 835 incubado

con álcali. Estos tratamientos parecen haber inducido cambios bioquímicos y/o conformacionales en estos microorganismos que han generado nuevos grupos funcionales o estructuras ausentes o no expuestas en las células viables. Estos cambios pueden ser los responsables de la aparición de la capacidad inhibitoria de *novoo*, aunque no podemos descartar que esta característica sí se encontrara en células viables de estos microorganismos, pero en un grado indetectable por nuestro método experimental. Este puede ser el caso de *B. breve* CECT 8606, cuya capacidad inhibitoria en forma de bacterias vivas alcanza el 30 % (límite de selección que nos impusimos) aunque con una variabilidad que ocasiona que esta reducción no sea siempre estadísticamente significativa. El tratamiento térmico de *B. breve* CECT 8606 puede ser responsable de un mínimo incremento en su capacidad inhibitoria, lo que da lugar a resultados más reproducibles. El incremento en la capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol tras ser objeto de un proceso de inactivación ya lo hemos observado en el caso de *L. reuteri* CECT 8506, cepa que exhibe un mayor grado de inhibición en forma de células inactivadas térmicamente que en forma de células viables (Tabla 4.1).

En conjunto, los resultados de los experimentos de búsqueda de inhibidores de la absorción de fluoresterol nos ha permitido confirmar otro aspecto, ya observado sobre la misma colección de muestras (Sañudo et al., 2016) y por otros autores (Wong y Ustunol, 2006), y es que las características funcionales de una colección de microorganismos pueden ser modificadas mediante tratamientos físico-químicos de forma que la diversidad funcional de dicha colección se incrementa significativamente. El resultado de nuestros ensayos, empleando muestras viables e inactivadas mediante 7 métodos, nos ha permitido identificar 6 cepas activas, mientras que el análisis únicamente de muestras viables hubiese dado lugar a la selección de sólo 3 cepas positivas.

5.5. Mecanismo de acción de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606

Hemos mencionado previamente el interés científico y comercial que existe en prevenir y/o tratar la hipercolesterolemia y otras dislipidemias mediante el consumo de bacterias probióticas (Anandharaj et al., 2014; Khani et al., 2012). Uno de los aspectos que más incertidumbre arroja sobre los resultados de diversos ensayos *in vivo* realizados para evaluar la eficacia del consumo de probióticos, es el desconocimiento del mecanismo de acción que sustenta los beneficios que se atribuyen a dichos probióticos (Ooi y Liang, 2010).

Nuestro trabajo se ha centrado en tratar de conocer el mecanismo de acción de dos cepas seleccionadas en nuestro programa de búsqueda: *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606. Acotar el objetivo de nuestro estudio a estas dos cepas se debió a la imposibilidad de destinar recursos al análisis de las 6 cepas inicialmente identificadas como positivas. La elección de *L. reuteri* CECT 8605 como uno de los candidatos fue sencilla, debido a que fue el microorganismo que indujo la mayor reducción en la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29, además de ser activo tras tres métodos de inactivación: térmico (factible industrialmente), mediante microondas y tras incubación con ácido (eleva la probabilidad de mantener su actividad tras sufrir una digestión gástrica). La elección del otro microorganismo no resultó tan fácil, y tuvimos que basarnos en criterios científicos, comerciales e industriales: (i) *B. breve* CECT 8606 pertenece a otro género, por lo que podría haber exhibido un mecanismo de acción diferente al identificado en *L. reuteri* CECT 8605, (ii) es un microorganismo aislado de leche materna humana y se enmarca en una línea de productos de Biosearch, S.A. (*Heredium*[®]) y (iii) es activo después de ser inactivado térmicamente (proceso fácil de realizar industrialmente).

La actividad hipocolesterolemica observada en distintas bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*, se ha tratado de explicar a través de distintos mecanismos: hidrólisis de sales biliares, captación de colesterol (por asimilación, adhesión a la pared celular o incorporación a la membrana plasmática), co-

precipitación, conversión a co-prostanol o liberación de ácidos grasos de cadena corta producto de la fermentación de estos microorganismos (Ooi y Liong, 2010). Nuestros ensayos se centraron en evaluar 3 de estas alternativas (hidrólisis de sales biliares, conversión/degradación y captación) junto a una cuarta posibilidad: interacción con transportadores específicos presentes en los enterocitos.

Los resultados de nuestros ensayos demostraron que ninguna de las dos cepas estudiadas, *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, son capaces de degradar fluoresterol. La estabilidad de la fluorescencia de esta molécula, durante una incubación de 23 h, indicó que los resultados de nuestros ensayos de inhibición de absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 no se debían a la transformación de esta molécula por acción de las muestras bacterianas, ni eran un artefacto por una posible pérdida de propiedades fluorescentes inducida también por dichas muestras bacterianas. Indirectamente, la capacidad inhibitoria que presentan células inactivadas térmicamente de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 ya apuntaba a que el mecanismo de acción no residía en la presencia de alguna dotación enzimática específica, como la enzima colesterol reductasa presente en algunas cepas del género *Lactobacillus* con capacidad de producir co-prostanol a partir de colesterol (Lye et al., 2010a).

El mismo hecho mencionado en el párrafo anterior, la detección de capacidad de inhibir absorción de fluoresterol en células inactivadas, es clave para descartar que el mecanismo que explica la actividad de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 se base en su capacidad de hidrolizar sales biliares. Nuestros resultados con la cepa de *L. plantarum* aislada de un producto comercial, y con actividad hidrolasa de sales biliares confirmada en los ensayos con enterocitos HT-29, demostraron que nuestro método de análisis sí era capaz de detectar microorganismos con esta capacidad. Sin embargo, la inactivación de este microorganismo abolió completamente su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol, a diferencia de lo observado repetidamente en *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 (Figura 4.20). Aunque descartamos la hidrólisis de sales biliares como el mecanismo de acción de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, no olvidamos que estos dos microorganismos, en forma de células viables, sí exhiben cierta capacidad de hidrolizar sales biliares, aunque de una magnitud muy inferior a la observada en la cepa de *L. plantarum* mencionada (Figura 4.3). La actividad hidrolasa de

sales biliares puede ser inducida en algunas cepas de *Lactobacillus* (Bron et al., 2006; Duary et al., 2011) y podría serlo también en cepas del género *Bifidobacterium* (Yuan et al., 2008) por lo que no descartamos trabajar, en un futuro, en la optimización de la obtención de variantes de las cepas *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 con una mayor expresión de esta actividad.

La proteína de membrana NPC1L1 juega un papel clave en el sistema de transporte del colesterol al interior del enterocito (Altmann et al., 2004) junto a otras proteínas como SR-BI (Bura et al., 2013), como hemos descrito en la introducción de esta memoria. Estudios en roedores indican que NPC1L1 podría mediar en la absorción de hasta un 70 % del colesterol intestinal (Altmann et al., 2004; Davis et al., 2004), por lo que es una diana clara para productos que persigan reducir la absorción de esta molécula, como el medicamento ezetimiba (Ge et al., 2008). Por este motivo, nos planteamos comprobar si *L. reuteri* CECT 8605 reducía la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 bloqueando la actividad de esta proteína. Las dos aproximaciones indirectas para determinar si esta cepa inhibía o inactivaba NPC1L1, bloqueando la formación de vesículas de clatrina, necesarias para el transporte de colesterol vía NPC1L1 (Brown et al., 2007), e inhibiendo dicho transportador con ezetimiba no arrojaron resultados positivos. En ambos casos, la presencia de *L. reuteri* CECT 8605 en los ensayos de absorción provocó un efecto aditivo sobre la reducción de la absorción de fluoresterol inducida por el bloqueo de las vesículas de clatrina y la inhibición específica de NPC1L1 con ezetimiba. Siendo conscientes de que pueden existir otros factores que expliquen nuestros resultados, consideramos que *L. reuteri* CECT 8605 inhibe la absorción de fluoresterol por otros mecanismos distintos a la inhibición o bloqueo de NPC1L1. Por otro lado, existen algunos estudios que describen un efecto de cepas probióticas sobre la expresión de NPC1L1 en cultivos de enterocitos. Se ha observado que algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* reprimen la expresión de NPC1L1, posiblemente por medio de la síntesis de moléculas efectoras solubles (Huang y Zheng, 2010). En otros estudios, se ha observado que las moléculas responsables de esta modulación de la expresión de NPC1L1 podrían ser componentes de la pared celular, activos tanto en células viables como en células inactivadas térmicamente (Yoon et al., 2013). Nuestros ensayos de análisis de la expresión génica llevados a cabo con células HT-29 en presencia de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8605, inactivados

térmicamente, no mostraron ningún efecto de estos microorganismos sobre la expresión del gen NPC1L1 (Figura 4.23). Estos resultados nos permiten descartar que algún componente de su envoltura celular o producto de su metabolismo (los sobrenadantes de los cultivos de ninguno de los dos microorganismos mostraron actividad inhibitoria sobre la absorción de fluoresterol) actúen como represores del gen *NPC1L1* y, por tanto, este sea el mecanismo por el cual *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 ejercen su efecto sobre la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29.

Varios microorganismos de diversas especies, incluidos lactobacilos y bifidobacterias, han demostrado ser capaces de captar colesterol del medio extracelular (Kimoto et al., 2002; Pereira y Gibson, 2002; Tomaro-Duchesneau et al., 2014; Usman y Hosono, 1999). Estos antecedentes, nos llevaron a estudiar si el efecto que ejercen *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 sobre la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29, se debía a un proceso de secuestro de esta molécula del medio extracelular. Los primeros ensayos que llevamos a cabo se realizaron incubando estos microorganismos y micelas lipídicas en las mismas condiciones empleadas en los experimentos con cultivos de enterocitos HT-29. Tras la incubación, se trató de cuantificar el colesterol o fluoresterol incorporado en las bacterias y variaciones en la concentración de estas moléculas en el medio extracelular (datos no mostrados). Los resultados de estos ensayos arrojaron datos poco reproducibles con una elevada variabilidad que no permitieron extraer ninguna conclusión. De igual forma, intentamos detectar la incorporación de colesterol a la envoltura bacteriana de ambas cepas, empleando células incubadas con micelas de colesterol, que se emplearon como material a partir del cual purificamos las envolturas bacterianas. La cuantificación bioquímica de colesterol en estas muestras, de nuevo, no nos permitió comprobar si esta molécula era asimilada por *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, específicamente por incorporación en sus envolturas, debido a una pobre reproducibilidad de los datos (resultados no mostrados).

A pesar de estos resultados inconcluyentes mencionados, los ensayos llevados a cabo mediante microscopía laser confocal con *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 incubados con micelas de fluoresterol, no dejaron apenas dudas de que ambos microorganismos son capaces de captar esta molécula fluorescente del medio

extracelular (Figura 4.25). Adicionalmente, los experimentos realizados mediante fluorocitometría para analizar la fluorescencia celular bacteriana, revelaron una mayor capacidad de captar fluoresterol por parte de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 que otras cepas presentes en nuestra colección (Figura 4.24). Por tanto, muy probablemente, la competencia entre las muestras bacterianas y los enterocitos HT-29 por absorber fluoresterol es el mecanismo por el cual *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, tanto vivos como inactivados térmicamente, reducen la absorción del análogo del colesterol en nuestros ensayos *in vitro*.

5.6. Localización celular del fluoresterol captado por *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606

El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal apuntan a que el fluoresterol se acumula en el espacio citoplasmático, tanto en *L. reuteri* CECT 8605 como en *B. breve* CECT 8606. La superposición del patrón de fluorescencia del marcador fluorescente DAPI, señalizando en este caso el citoplasma bacteriano, con el obtenido con fluoresterol lo indica así, aunque no podemos descartar que también se produzca cierta incorporación de este compuesto en la envoltura bacteriana de ambas cepas. La capacidad de captar colesterol del medio extracelular por lactobacilos y bifidobacterias se conoce desde hace décadas (Gilliland et al., 1985; Rašić et al., 1992; Tahri et al., 1996) y se ha postulado como uno de los mecanismos por los cuales estos microorganismos podrían modular la absorción de esta molécula en el ser humano (Ooi y Liong, 2010).

Varios de los estudios llevados a cabo por otros investigadores, han llegado a la conclusión de que el colesterol presente en el medio extracelular, tras una incubación prolongada (12-24 h) y preferiblemente en presencia de sales biliares, es asimilado incorporándose a la membrana bacteriana. Un número significativo de estos estudios, se ha llevado a cabo cuantificando la reducción de la concentración de colesterol del medio extracelular, analizando la composición de ácidos grasos celulares y/o caracterizando la fluidez de la membrana bacteriana (Dambekodi y Gilliland, 1998; Kimoto et al., 2002; Lin

y Chen, 2000; Lye et al., 2010a; Miremadi et al., 2014; Noh et al., 1997; Pereira y Gibson, 2002; Remagni et al., 2013; Taranto et al., 2003), y los resultados de dichos experimentos han llevado a postular dicha incorporación del colesterol en la membrana de las distintas cepas bacterianas estudiadas. En particular, la modificación en la composición de ácidos grasos observada en algunas cepas cultivadas en presencia de colesterol y sales biliares, se ha discutido como una adaptación bacteriana a condiciones de estrés, mediada por la alteración de la fluidez de la membrana (Kimoto et al., 2002; Lye et al., 2010a; Miremadi et al., 2014; Remagni et al., 2013; Taranto et al., 2003; Zanotti et al., 2015), siendo quizá la fuente de estrés la propia incorporación de colesterol en la membrana de microorganismos que no incluyen esta molécula como constituyente habitual de sus membranas. De todos modos, al menos en la bibliografía consultada, hemos encontrado pocos datos directos que indiquen que el destino principal de colesterol asimilado por cepas de lactobacilos y bifidobacterias sea la membrana bacteriana. En este sentido, algunos estudios llevados a cabo con cepas de las especies *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *B. bifidum* y *B. longum* indican que, al menos una fracción del colesterol asimilado (10-20 % en algunos casos), es efectivamente incorporado en la envoltura bacteriana (Dambekodi y Gilliland, 1998; Noh et al., 1997; Taranto et al., 1997; 2003; Zanotti et al., 2015). No es descartable que coexistan distintos mecanismos por los cuales diferentes microorganismos puedan asimilar colesterol: incorporación a la membrana bacteriana como hemos descrito, adhesión o adsorción a la envoltura celular como otros autores apuntan (Choi y Chang, 2015; Lin y Chen, 2000; Lye et al., 2010b; Usman y Hosono, 1999) o acumulación en el citoplasma como hemos observado en nuestros ensayos con *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606.

Otra diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por otros grupos de investigación es el incremento de actividad, entendida como capacidad de reducir la absorción de fluoresterol en los cultivos de enterocitos, que observamos tras inactivar térmicamente *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606. En la mayoría de los estudios publicados, las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que son capaces de asimilar, incorporar o unir colesterol, muestran una significativa reducción de esta capacidad cuando se analizan en estado latente o tras algún proceso de inactivación (Choi y Chang, 2015; Kimoto et al., 2002; Liong y Shah, 2005; Miremadi et al., 2014; Zeng et al., 2009).

Este hecho puede deberse a que la incorporación del colesterol a la envoltura celular, en los microorganismos estudiados, precise que dichas cepas se encuentren metabólicamente activas. *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606, por el contrario, no necesitan encontrarse en crecimiento o en estado latente para captar fluoresterol, lo que parece apuntar a que esta capacidad reside en características específicas de estas cepas, quizá relacionadas con aspectos vinculados a la composición y/o estructura de su envoltura celular, tal y como parece ocurrir con la capacidad de captar colesterol que muestra la cepa *L. plantarum* EM (Choi y Chang, 2015).

5.7. Activación de la capacidad de *L. reuteri* CECT 8605 de captar fluoresterol

La optimización del proceso de cultivo de *L. reuteri* CECT 8605, con el objeto de obtener una mayor concentración de células viables en la fase estacionaria de crecimiento, reveló que las condiciones de incubación a las que se somete a esta cepa determinan drásticamente su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos HT-29 (Figura 4.27). Los cambios en las condiciones de crecimiento, medio de cultivo CR20 pH 5 frente a medio General pH 6, que permitieron obtener cultivos con una mayor concentración de bacterias viables, indujeron sin embargo que las suspensiones de dichas bacterias no exhibieran la capacidad para reducir la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29, característica de *L. reuteri* CECT 8605. Este resultado inesperado, acabó siendo sorprendente, en cierta medida, al tratar de identificar qué factor o factores podrían explicarlo. Ninguno de los ingredientes del medio de cultivo, ni el tiempo de incubación durante la etapa de crecimiento, demostraron ser los responsables ni de la mejora en el rendimiento (en cuando a ufc/mL), del cultivo en medio CR20 ni de la obtención de células capaces de captar fluoresterol en medio General. Por el contrario, el pH del medio de cultivo resultó ser el factor clave. Los datos obtenidos con una batería de cultivos en medio CR20, en las cuales se ensayaron distintos valores de pH de crecimiento (Figura 4.30), y el análisis de las muestras derivadas en el modelo de enterocitos HT-29, nos permitieron confirmar la

correlación entre este parámetro, la concentración de bacterias viables y la capacidad de captar fluoresterol de *L. reuteri* CECT 8605.

La posibilidad de modular algunas actividades microbiológicas, con aplicación en el control de la absorción de colesterol por medio de las condiciones de cultivo, se ha detectado en varias cepas probióticas. Sin embargo, las observaciones presentadas por otros investigadores están basadas en parámetros clave que determinan el estado metabólico bacteriano, como encontrarse en fase de crecimiento exponencial o en fase estacionaria (Pereira y Gibson, 2002; Remagni et al., 2013). Como hemos mencionado previamente, la mayor parte de lactobacilos y bifidobacterias con habilidad de asimilar colesterol, pierden en gran medida esta capacidad si se encuentran en estado latente o tras ser sometidos a procesos de inactivación. Es lógico por tanto, que en un estado metabólico más activo durante la fase exponencial de crecimiento, sean favorecidas las características bioquímicas que permiten la captación y/o asimilación de colesterol. Por otro lado, se ha demostrado la influencia de factores concretos en el cultivo de la cepa *L. casei* LA-1, como la temperatura de crecimiento, concentración del inóculo y el pH inicial del medio de cultivo, sobre su capacidad de reducir la concentración de colesterol extracelular (Kumar et al., 2013a). Sin embargo, los datos obtenidos con esta cepa, específicamente al analizar el efecto del pH del medio de cultivo, parecen reflejar una correlación entre el pH inicial y su capacidad hipocolesterolémica (incrementada a pH 6,5 frente a valores superiores e inferiores) mediada por una mayor obtención de biomasa. No parece ser el caso de *L. reuteri* CECT 8605, ya que nuestros ensayos no han mostrado un mayor crecimiento a pH 6 frente a pH 5, ni cuantificado en forma de células viables ni en forma de biomasa. Además, nuestros ensayos se realizaron con suspensiones bacterianas obtenidas en cultivos con pH controlado a lo largo de todo el cultivo, por lo que no son completamente comparables a los obtenidos por Kumar y colaboradores (Kumar et al., 2013a). En nuestras condiciones de ensayo, la modificación de una unidad en el pH de crecimiento, de pH 5 a pH 6, induce un cambio drástico en la capacidad de *L. reuteri* CECT 8605 de captar fluoresterol, reflejando un punto de inflexión más que una progresión en las características que le permiten a este microorganismo ejercer su actividad hipocolesterolémica.

La particularidad del fenómeno observado en *L. reuteri* CECT 8605, al ser cultivado bajo distintos pH, fue confirmada al cultivar y ensayar la capacidad hipocolesterolémica, en enterocitos, de otros microorganismos de nuestra colección sometidos a distintas condiciones de crecimiento (Figura 4.32). Cuatro cepas mostraron una mayor actividad inhibitoria sobre la absorción de fluoresterol al modificar sus condiciones de cultivo. *L. coryniformis* CECT 5711 incrementó significativamente su actividad al modificarse el medio de cultivo y el pH de crecimiento de 6 a 5, en sentido contrario a lo observado en *L. reuteri* CECT 8605. *L. salivarius* CECT 7261 también mostró una mejora en su capacidad inhibitoria, pero al modificar factores distintos del pH de crecimiento. Únicamente *L. salivarius* CECT 5713 y *L. gasseri* CECT 5714 incrementaron su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol en enterocitos HT-29 al alcalinizar el medio de cultivo (Figura 4.32), tal y como ocurre con *L. reuteri* CECT 8605. Sin embargo, no observamos un descenso en la concentración de bacterias viables al cultivar *L. salivarius* CECT 5713 en medio a pH 6 (Tabla 4.4), fenómeno que también caracteriza el proceso de obtención de muestras activas de *L. reuteri* CECT 8605. Por otro lado, *L. gasseri* CECT 5714 sí presentó una baja eficiencia de crecimiento al ser cultivado a pH más alcalino, si bien otros aspectos (baja concentración de biomasa obtenida en los cultivos de *L. gasseri* CECT 5714 a pH alcalino) no permiten asumir que las características observadas en *L. reuteri* CECT 8605 se encuentren replicadas en *L. gasseri* CECT 5714. La necesidad de focalizar los recursos en el análisis de una única cepa hicieron que nos centráramos en el estudio de los aspectos bioquímicos y/o moleculares que permiten a *L. reuteri* CECT 8605 captar fluoresterol del medio extracelular. Aun así, no descartamos profundizar en la aplicación de las otras combinaciones de cepas y condiciones de cultivo, identificadas como muestras probióticas con actividad inhibitoria en estos ensayos, para regular la absorción de colesterol en próximos estudios *in vitro* y/o *in vivo*.

5.8. Caracterización de la capacidad de *L. reuteri* CECT 8605 para captar fluoresterol

L. reuteri CECT 8605 reduce la absorción de fluoresterol en cultivos de enterocitos debido a su capacidad de captar esta molécula y acumularla principalmente en el citoplasma bacteriano. El primer paso en el proceso de captación debería ser la interacción de la envoltura bacteriana con las micelas de fluoresterol, por lo que quizá una mayor afinidad o permeabilidad de dicha envoltura hacia los complejos lipídicos podría explicar la actividad detectada en dicha cepa. La diferente actividad de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado bajo distintos pH también podría tener cabida en esta hipótesis, ya que otros autores han afirmado que variaciones en las condiciones de cultivo pueden ser responsables de cambios en estructuras de membrana y/o pared celular que facilitan la incorporación o adsorción de colesterol por otras cepas probióticas (Noh et al., 1997). Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica revelan cambios sustanciales en la envoltura bacteriana de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6, que apuntan a una menor densidad y/o organización de dicha envoltura. Estos resultados, junto a los datos semi-cuantitativos de concentración de peptidoglicano, son compatibles con la hipótesis que barajamos.

La modificación que sufre la envoltura celular de *L. reuteri* CECT 8605 cultivado a pH 6, sin embargo, no parece deberse a cambios estructurales o exposición de grupos funcionales provocados químicamente por una menor concentración de H^+ . Por una parte, pH 6 es un valor cercano a la neutralidad y considerado adecuado para la fisiología celular de bacterias lácticas, lo que no supone una situación de estrés para la bacteria (van de Guchte et al., 2002). Además, comprobamos en nuestros ensayos de cambio de pH durante el cultivo (Figura 4.31) que la activación de la capacidad de captar fluoresterol de bacterias cultivadas a pH 5 con un cambio a pH 6 solo se produce en presencia de una fuente de carbono que permita mantener cierto grado de metabolismo activo. La presencia de una enzima lítica cuya expresión se correlaciona con el grado de actividad inhibitoria que presentan las células de *L. reuteri* CECT 8605 (Figura 4.37) y, por tanto, también con el pH de cultivo, parece sustentar la existencia de un proceso molecular regulado por pH, que da lugar a la generación del fenotipo activo

en cuanto a la capacidad de captar fluoresterol. Sin embargo, los ensayos de hibridación substractiva, diseñados para detectar genes sobreexpresados en *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6, no nos permitieron identificar ningún gen cuya función conocida pudiera explicar la capacidad de esta cepa de captar fluoresterol, ni la alteración de la envoltura celular observada mediante microscopía electrónica. Estos experimentos detectaron la sobreexpresión de algunos genes codificadores de proteínas transportadoras, que quizá podría pensarse que estuvieran implicadas en algún mecanismo de transporte de colesterol/fluoresterol. Sin embargo, la mayor actividad captadora de fluoresterol que presentan las células de *L. reuteri* CECT 8605 sucede tras ser sometidas a inactivación térmica, lo que indica que el proceso de interiorización del fluoresterol del medio extracelular se basa en un mecanismo pasivo. Por ello, la sobreexpresión de estos genes de proteínas transportadoras, así como el de los otros genes identificados en el ensayo de hibridación sustractiva, puede deberse tanto a adaptaciones del microorganismo a las distintas condiciones de crecimiento, no relacionadas con la actividad inhibitoria de la absorción de fluoresterol, como una menor concentración de H^+ (Lee et al., 2011). Sí detectamos dos grupos de genes: ribosomales y recombinasas/integrasas, cuyo número de secuencias sobreexpresadas en *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 es llamativo. Este patrón de expresión parece ser característico de la cepa estudiada, no siendo observado al analizar la expresión de un limitado número de los genes mencionados en otras cepas de *L. reuteri* estudiadas (Figura 4.40). Hasta la fecha, no hemos podido determinar si esta característica genética puede estar relacionada con la alteración de la envoltura celular de *L. reuteri* CECT 8605 ni con su capacidad de captar fluoresterol.

Varias características que exhibe *L. reuteri* CECT 8605 cultivado en medio General pH 6 parecían apuntar a la presencia de un bacteriófago activo, al menos parcialmente: baja concentración de bacterias viables (Tabla 4.2), presencia de una enzima lítica (Figura 4.37) e inducción de varios genes codificadores de integrasas/recombinasas (Tabla 4.6, Figura 4.38). Sin embargo, los ensayos realizados para tratar de detectar fagos activos (lisis en cultivo líquido, formación de placas de lisis en medio sólido y detección de ADN vírico en sobrenadantes de cultivos) no aportaron datos concluyentes que nos permitieran confirmar la presencia de algún bacteriófago capaz de entrar en fase lítica en *L. reuteri* CECT 8605. Aun así, la correlación en el grado

de actividad lítica frente a *M. luteus*, detectado mediante zimogramas, la baja concentración de bacterias viables en cultivos líquidos y el pH del medio extracelular, hacen difícil descartar que la autolisina o endolisina detectada esté implicada en los procesos que permiten a *L. reuteri* CECT 8605 captar fluoresterol del medio extracelular. No disponemos de datos que nos permitan asociar inequívocamente la enzima lítica detectada en los ensayos con zimogramas con el gen codificador de este tipo de enzima (gen *LAR 1322*), detectado en nuestra cepa. Sin embargo, solo aquellas cepas de *L. reuteri* que poseen este gen (Tabla 4.8) presentan una banda electroforética activa en los zimogramas (Figura 4.41). Por otro lado, además de *L. reuteri* CECT 8605, la cepa *L. reuteri* CECT 7266 también muestra una mayor actividad lítica y una mayor expresión del gen *LAR 1322* al ser cultivado a pH 6 frente a pH 5 (Figura 4.42). El hecho de que únicamente *L. reuteri* CECT 8605 sea capaz de captar fluoresterol hace pensar que hay otros factores, no identificados aún, además de la actividad lítica, implicados en la aparición del fenotipo activo de esta cepa.

Las enzimas líticas presentes en microorganismos pueden estar implicadas en procesos diversos, como la separación de bacterias tras la división celular, manteniendo de la morfología, reciclado de componentes de la pared, actividad antibacteriana frente a competidores y, por supuesto, la lisis y muerte celular (Lai et al., 2011; Loessner, 2005; Rice y Bayles, 2008; Uehara y Bernhardt, 2011). Los ejemplos más estudiados de muerte bacteriana mediada por una enzima lítica producida intracelularmente, son los inducidos por enzimas codificadas por genes víricos (endolisinas; Oliveira et al., 2013; Rice y Bayles, 2008). La muerte celular se da por la degradación de la pared bacteriana una vez la endolisina presente en el citoplasma accede al peptidoglicano gracias a otras proteínas víricas (holinas) que facilitan su activación y/o transporte al espacio periplásmico. La búsqueda en *L. reuteri* CECT 8605 de genes descritos en otras cepas de *L. reuteri* como codificadores de holinas, arrojó resultados negativos. Estudios llevados a cabo con otras especies (Rice y Bayles, 2008; Young et al., 2000) apuntan a que, en sistemas líticos basados en endolisinas/holinas, la expresión de la endolisina por sí misma, en ausencia de holinas, no induce la muerte celular. Es posible que *L. reuteri* CECT 8605 exprese otros genes codificadores de holinas, distintos a los analizados en nuestros ensayos, o que la degradación de la pared celular pueda producirse por acción de una endolisina que no requiera la presencia de holinas, hecho descrito por otros

autores (Frias et al., 2013; Loessner, 2005). Como hemos mencionado anteriormente, deben existir otras características específicas de *L. reuteri* CECT 8605, cuya naturaleza desconocemos actualmente, que determinen que este microorganismo pueda captar fluoresterol al ser cultivado a pH 6, además de la actividad endolítica inducible por pH detectada en nuestros ensayos.

5.9. Capacidad de *B. breve* CECT 8606 de captar fluoresterol

B. breve CECT 8606 es capaz de captar fluoresterol del medio extracelular, al igual que lo hace *L. reuteri* CECT 8605, y este es el mecanismo de acción por el cual ambas cepas inhiben la absorción de esta molécula en nuestro modelo *in vitro* con enterocitos HT-29. Además de compartir el mecanismo de acción, los dos microorganismos exhiben otras similitudes: sus células son más activas tras ser sometidas a tratamiento térmico (Figura 4.17) y acumulan el fluoresterol principalmente en el citoplasma (Figura 4.25). Por el contrario, *B. breve* CECT 8606 no ha demostrado que su capacidad de captar fluoresterol dependa de las condiciones de su cultivo, con un patrón similar a *L. reuteri* CECT 8605 (Figura 4.32).

Es lógico pensar que la capacidad de captar colesterol del medio extracelular que posee un microorganismo depende en gran medida de la permeabilidad de su envoltura celular. Esto se ha observado en varias cepas del género *Lactobacillus* en las que, mediante ultrasonidos o electroporación, se ha correlacionado el incremento en la permeabilidad con una mayor capacidad de asimilar colesterol (Lye et al., 2011, 2012a, 2012b). Por tanto, podemos suponer que la envoltura celular de esta bifidobacteria es más permeable que la de otras cepas del mismo género, al menos las analizadas en nuestros ensayos, y que esta permeabilidad se ve incrementada tras la incubación a altas temperaturas. Este efecto también se observa en *L. reuteri* CECT 8605, en el que las células inactivadas térmicamente son también más eficientes en su capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol. La muerte bacteriana inducida por calor se atribuye a la desnaturalización irreversible de distintos componentes celulares: ribosomas, ADN y

proteínas; aunque a altas temperaturas (120 °C) llega a alterarse la pared bacteriana (Lee y Kaletunc, 2002).

No detectamos en *B. breve* CECT 8606 la presencia de enzimas líticas mediante zimogramas (resultados no mostrados) por lo que, en principio, descartamos que su capacidad de captar fluoresterol sea determinada por un mecanismo similar al hipotetizado en *L. reuteri* CECT 8605. Quizá otros ensayos futuros, analizando el efecto del tratamiento térmico sobre la estructura y morfología celular de esta bacteria, y su influencia sobre la permeabilidad a micelas de fluoresterol u otros compuestos, pueda aclarar por qué *B. breve* CECT 8606 puede captar fluoresterol.

5.10 Actividad hipocolesterolémica *in vivo* de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606.

Existen varios modelos animales de hiperlipidemia en los que se puede estudiar la eficacia de principios activos con presunta capacidad hipocolesterolémica (Kris-Etherton y Dietschy, 1997). A grandes rasgos, podemos diferenciar los modelos que inducen dicho estado patológico mediante dietas específicas (alto contenido en grasa, colesterol y/o sales biliares; principalmente) y modelos basados en animales modificados genéticamente (por ejemplo, receptores LDL o apolipoproteína E deficientes; Kapourchali, 2014). Los modelos basados en dietas hipercolesterolémicas presentan el problema de que los roedores pueden ser resistentes al desarrollo de hipercolesterolemia y aterosclerosis, debido a que poseen una alta concentración de HDL en plasma y baja proporción de lipoproteínas LDL, debido a que la eliminación de dichas lipoproteínas es bastante más elevada que en humanos (Dietschy et al., 1993; Parolini et al., 2012). Por este motivo, a pesar de que siguen llevándose a cabo estudios en estos modelos basados en la dieta en roedores (Afonso et al., 2013; da Motta et al., 2013; Tsai et al., 2014), cada vez más estudios sobre el metabolismo del colesterol se están llevando a cabo en animales genéticamente modificados deficientes en receptores LDL (rLDL) o apolipoproteína E (apoE; Zaragoza et al., 2011). Sin embargo, dado que nos planteamos evaluar la actividad de dos bacterias con capacidad de absorber colesterol

intestinal, consideramos necesario emplear un modelo basado en la dieta, en el que *a priori*, la eliminación del factor hipercolesterolémico por una reducción en la absorción de colesterol, debería reflejarse en parámetros fisiológicos.

Los resultados del ensayo, en cuanto a colesterol total sérico a lo largo del tiempo, mostraron un incremento medio, estadísticamente significativo, del 20 % en el control hipercolesterolémico con respecto al control sano, a partir del día 57 de intervención (Figura 4.43). La magnitud de este incremento fue menor de lo esperado y se observó en una etapa tardía del ensayo, comparando nuestros datos con los obtenidos en otros ensayos realizados en condiciones similares (Afonso et al., 2013; Kumar et al., 2013b; da Motta et al., 2013). Una posible explicación puede ser la resistencia de las ratas a desarrollar hipercolesterolemia y aterosclerosis (Joris et al., 1983), debido al incremento de síntesis de sales biliares a partir de colesterol que se produce en el hígado de estos animales tras ingerir una dieta enriquecida en colesterol (Moghadasian, 2002). Por este motivo, algunos investigadores complementan la dieta, además de con colesterol, con ácido cólico, cuyo efecto es un incremento en la absorción de colesterol e inhibición de la síntesis de ácidos biliares (Colina-Coca et al., 2014; Joris et al., 1983; Thiruchenduran et al., 2011). Aun así, existen ejemplos de ensayos realizados en roedores con dietas hipercolesterolémicas, complementadas con ácido cólico o no, con resultados muy dispares en cuando a la respuesta en forma de concentración de colesterol total sérico (Csont et al., 2002; Onyeike et al., 2012).

El principal inconveniente de la moderada hipercolesterolemia, instaurada en los grupos de animales que consumieron pienso con colesterol, fue el bajo margen efectivo para detectar una reducción, significativa estadísticamente, en el colesterol total sérico. De esta forma, no observamos una disminución significativa y mantenida en el tiempo en los niveles de colesterol total que pudiéramos atribuir al consumo de *L. reuteri* CECT 8605 o *B. breve* CECT 8606, vivos o inactivados térmicamente. Detectamos valores de colesterol total menores en alguno de los grupos que consumieron probióticos, en varios tiempos de ensayo, pero sin significancia estadística en algunos casos, o sin coherencia con el resto de tiempos. Por todo ello, no podemos concluir si la ausencia de efecto sobre el colesterol total sérico es atribuible a la ineficacia de los microorganismos estudiados o a la respuesta deficiente, en algunos aspectos, que demostró el modelo

animal seleccionado. Nuevos ensayos en otro modelo animal, quizá en roedores deficientes en receptores LDL y con dieta enriquecida en colesterol, podrían aportar datos que nos permitirían comprobar el efecto del consumo de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 sobre los niveles de colesterol total sérico.

Por otro lado, los análisis realizados con las muestras obtenidas tras 94 días de intervención, demostraron una respuesta clara en ciertos parámetros en los animales sometidos a una dieta enriquecida con colesterol. Las concentraciones de elementos plasmáticos lipídicos (colesterol HDL y LDL) y no lipídicos (glucosa) sufrieron modificaciones significativas en los animales que consumieron colesterol (Figura 4.44 y 4.45). El grupo control hipercolesterolémico exhibió un aumento en los niveles de lipoproteínas LDL y un descenso en HDL con respecto al grupo control sano (Figura 4.44.A y B). Esta respuesta ante una dieta rica en colesterol se ha descrito en varios ensayos llevados a cabo en roedores (Hu et al., 2013; Kumar et al., 2013b; Onyeike et al., 2012). Se ha postulado que la reducción de la síntesis de receptores LDL y/o de actividad HMG-CoA reductasa, provocado por el exceso de colesterol en la dieta, pueden ser la causa de una menor captación de LDL plasmático y de una menor síntesis de colesterol *de novo*, lo que explicaría las alteraciones en los valores plasmáticos de colesterol LDL y HDL (Hu et al., 2013). En estas condiciones, el consumo de las dos cepas probióticas, tanto vivas como inactivadas térmicamente (grupos C-F), provocó un aumento en los niveles de colesterol HDL y un descenso en LDL de forma significativa, aproximando los valores a los obtenidos en el grupo control sano (Figura 4.44.A y B). Esta aparente restauración de los valores de colesterol HDL, LDL y por tanto, también del índice LDL/HDL, en los animales que consumieron *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 a un estado equiparable al observado en el grupo de animales control sano, podría interpretarse como una disminución de absorción de colesterol dietético y una normalización por tanto de la actividad de los receptores LDL y/o la síntesis de colesterol *de novo*. No podemos descartar, sin embargo, que otros mecanismos sean los responsables tanto del efecto de la dieta enriquecida en colesterol, como del consumo de los probióticos sobre el perfil lipídico de los animales de nuestro estudio *in vivo*. En este sentido, existe la hipótesis de que la alteración de la flora intestinal, inducida por una dieta hipercolesterolémica, puede ser responsable, al menos en parte, del incremento en la absorción de colesterol y otras alteraciones de parámetros lipídicos,

observado en animales alimentados con este tipo de dieta. La co-administración de especies probióticas junto a una dieta rica en colesterol o grasa, puede reducir el impacto de dicha dieta sobre la flora intestinal y modular las alteraciones derivadas (incremento de permeabilidad intestinal, modificación del perfil de ácidos grasos de cadena corta intestinales, favorecimiento de especies concretas...) que se correlacionan con concentraciones de lípidos plasmáticos anormales (Huang et al., 2014; Lahti et al., 2013; Tsai et al., 2014; Wang et al., 2012; Zanotti et al., 2015).

Hemos mencionado previamente el incremento significativo en la concentración de glucosa en sangre que observamos en el grupo de animales hipercolesterolémicos (grupo B) con respecto al grupo control sano (Figura 4.45). La interrelación entre el colesterol HDL y el metabolismo de glucosa ha sido observado en varios estudios y resumido en la revisión de Drew y colaboradores (Drew et al., 2012). Basándonos en esta información, el descenso en la concentración de colesterol HDL inducido por la dieta enriquecida en colesterol, puede haber provocado una mayor concentración de glucosa por factores tales como una menor secreción de insulina, descenso en la captación de glucosa por tejidos y/o resistencia a insulina mediada por la acción pro-inflamatoria asociada a la dislipidemia. En nuestro ensayo *in vivo*, la administración de *L. reuteri* CECT 8605 o *B. breve* CECT 8606, vivos o inactivados, reduce la hiperglucemia a valores próximos a los observamos en los animales control sanos. Aunque esta capacidad de regular la glucemia se ha observado en otros estudios en roedores realizados con cepas del género *Lactobacillus* (Park et al., 2013; Yadav et al., 2007), creemos que la reducción en la concentración de colesterol HDL es el factor clave que probablemente explica el efecto de ambas cepas sobre la concentración de glucosa observado en nuestro ensayo *in vivo*.

El efecto *in vivo* del consumo de varias cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, con características hipocolesterolémicas detectadas *in vitro*, ha sido ensayado en distintos modelos animales (Tabla 1.6). Además de la reducción, en distinto grado, de la concentración de colesterol total plasmático, varios estudios han detectado incrementos en colesterol HDL y/o reducción en colesterol LDL, si bien no son efectos que puedan ser considerados universales, especialmente el incremento en colesterol HDL (Hu et al., 2013; Huang et al., 2014; Tsai

et al., 2014; Xiao et al., 2003). Los distintos mecanismos asociados a la capacidad hipocolesterolemica de los microorganismos ensayados (hidrólisis de sales biliares, asimilación y/o metabolismo de colesterol, inhibición de NPC1L1, modulación de flora intestinal...) así como las diferencias inherentes a las distintas cepas bacterianas, pueden ser la razón de la aparente falta de reproducibilidad observada en los ensayos animales de eficacia de probióticos sobre la hipercolesterolemia. *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 podrían ser comparables a otras cepas probióticas que han demostrado ser capaces de asimilar colesterol en ensayos *in vitro*. Sin embargo, ambas cepas captan fluoresterol y lo acumulan principalmente en el citoplasma, a diferencia de lo que parece ocurrir en otros microorganismos donde el colesterol se incorpora a la envoltura bacteriana, por medio de procesos que requieren que los microorganismos se encuentren activos metabólicamente (Choi y Chang, 2015; Kimoto et al., 2002; Liong y Shah, 2005; Miremadi et al., 2014; Zeng et al., 2009). Esta diferencia, aunque parezca ser de poca importancia, puede ser la razón por la cual *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 vivos, pero también inactivados térmicamente, ejerzan un efecto similar en nuestros ensayos *in vivo*, cuando otros microorganismos han mostrado una patente menor actividad en ensayos *in vivo*, al ser administrados en forma inactiva (Jeun et al., 2010; Zanotti et al., 2015). La necesidad de resistir el proceso de digestión, factor generalmente determinante para que un microorganismo probiótico ejerza su efecto beneficioso *in vivo*, no es por tanto un aspecto clave a considerar en el caso de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606.

Globalmente, los resultados obtenidos tanto en los ensayos *in vitro* como en el ensayo *in vivo*, nos permiten ser optimistas en cuanto a una posible aplicación de las dos cepas probióticas seleccionadas, como agentes activos en productos diseñados para regular parámetros fisiológicos relacionados con la hiperlipidemia y/o el síndrome metabólico. Aun asumiendo que *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 no permitan reducir la concentración de colesterol total plasmático, hecho que es necesario confirmar, la modificación de los valores de colesterol HDL y LDL que observamos en los grupos animales que consumieron nuestras cepas, es un efecto relevante. Como ya se comentó en la introducción, el nivel de colesterol plasmático ligado a HDL está inversamente relacionado con la incidencia de aterosclerosis y determina la eficacia del transporte reverso (transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado;

Nofer et al., 2002). Además, el índice LDL/HDL, es considerado como uno de los más importantes parámetros informativos de salud/riesgo cardiovascular, más allá de los valores de colesterol total (Millán et al., 2009; Panagiotakos et al., 2003), y es el fin que se persigue con los nuevos compuestos inhibidores de la proteasa PCSK9 (Everett et al., 2015; White, 2015). De todas formas, son necesarios más estudios con el objeto de confirmar el efecto de *L. reuteri* CECT 8605 y *B. breve* CECT 8606 en otros modelos animales de hipercolesterolemia y, por supuesto, evaluar su eficacia en estudios clínicos.

Capítulo 6. Conclusiones

Tras el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los análisis *in vitro* realizados con las muestras de la colección de cepas probióticas y compuestos derivados en Biosearch, S.A.; han permitido identificar 9 muestras con capacidad de inhibir la absorción de fluoresterol. Dichas muestras fueron obtenidas a partir de las cepas: *Lactobacillus casei* BT 838, *Lactobacillus reuteri* CECT 8605, *Lactobacillus plantarum* BT 595, *Bifidobacterium breve* CECT 8606, *Lactobacillus fermentum* BT 584 y *Lactobacillus casei* BT 835.
2. *Lactobacillus reuteri* CECT 8605 y *Bifidobacterium breve* CECT 8606 poseen actividad hipocolesterolémica *in vitro* en forma de bacterias inactivadas térmicamente. *Lactobacillus reuteri* CECT 8605 exhibe dicha actividad, además, en forma de bacterias viables, e inactivadas con ácido y microondas.
3. El efecto hipocolesterolémico *in vitro* de *Lactobacillus reuteri* CECT 8605 y *Bifidobacterium breve* CECT 8606 se basa en su capacidad de captar fluoresterol del medio extracelular; impidiendo, de esta forma, que pueda ser absorbido por las células del epitelio intestinal.
4. La capacidad de secuestrar fluoresterol que exhiben *Lactobacillus reuteri* CECT 8605 y *Bifidobacterium breve* CECT 8606 es una característica específica de estas cepas, no siendo detectable en todos los miembros de estas dos especies.
5. Las condiciones de cultivo de la cepa *Lactobacillus reuteri* CECT 8605, específicamente el pH de cultivo, determinan su capacidad hipocolesterolémica. La alteración de la estructura de la envoltura celular de esta bacteria, cultivada a pH 6, es probablemente responsable de generar células más permeables a las micelas de fluoresterol.
6. El consumo de $2 \cdot 10^9$ ufc/día de las cepas *Lactobacillus reuteri* CECT 8605 y *Bifidobacterium breve* CECT 8606, tanto vivas como inactivadas

térmicamente, restablece valores normales de colesterol-HDL, colesterol-LDL y glucosa plasmáticos en ratas Wistar con estos parámetros alterados por medio de una dieta hipercolesterolémica.

Bibliografía

- Adams, C.A. (2010). The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* *23*, 37–46.
- Adams, M.R., Konaniah, E., Cash, J.G., and Hui, D.Y. (2011). Use of NBD-cholesterol to identify a minor but NPC1L1-independent cholesterol absorption pathway in mouse intestine. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G164–G169.
- Adisakwattana, S., Intrawangso, J., Hemrid, A., Chanathong, B., Mäkynen, K., and others (2012). Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. *Food Technol. Biotechnol.* *50*, 11–16.
- Afonso, M.S., de O Silva, A.M., Carvalho, E.B., Rivelli, D.P., Barros, S.B., Rogero, M.M., Lottenberg, A.M., Torres, R.P., and Mancini-Filho, J. (2013). Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Nutr. Metab.* *10*, 19.
- Alcántara, C., and Zúñiga, M. (2012). Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23. *Microbiology* *158*, 1206–1218.
- Altemus, J.B., Patel, S.B., and Sehayek, E. (2014). Liver-specific induction of *Abcg5* and *Abcg8* stimulates reverse cholesterol transport in response to ezetimibe treatment. *Metabolism* *63*, 1334–1341.
- Altmann, S.W., Davis Jr., H.R., Yao, X., Laverty, M., Compton, D.S., Zhu, L., Crona, J.H., Caplen, M.A., Hoos, L.M., Tetzloff, G., et al. (2002). The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1580*, 77–93.
- Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L.-J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* *303*, 1201–1204.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., and Parveen Rani, R. (2014). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia: A Review. *Chin. J. Biol.* *2014*, e572754.
- Armitage, J. (2007). The safety of statins in clinical practice. *The Lancet* *370*, 1781–1790.
- Atassi, F., and Servin, A.L. (2010). Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* *304*, 29–38.
- Auad, L., and Raya, R.R. (2001). Methods for Isolation and Titration of Bacteriophages from *Lactobacillus*. In *Food Microbiology Protocols*, (New Jersey: Humana Press), pp. 203–207.

- Barter, P. (2000). CETP and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 2029–2031.
- Béaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., and Carrière, V. (2009). Sensing of Dietary Lipids by Enterocytes: A New Role for SR-BI/CLA-1. *PLoS ONE* *4*.
- Begley, M., Hill, C., and Gahan, C.G.M. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 1729–1738.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., and Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* *126*, 278–285.
- Besler, C., Lüscher, T.F., and Landmesser, U. (2012). Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol. Med.* *4*, 251–268.
- Bettters, J.L., and Yu, L. (2010). Transporters as Drug Targets: Discovery and Development of NPC1L1 Inhibitors. *Clin. Pharmacol. Ther.* *87*, 117–121.
- Binnendijk, K. h., and Rijkers, G. t. (2013). What is a health benefit? An evaluation of EFSA opinions on health benefits with reference to probiotics. *Benef. Microbes* *4*, 223–230.
- Bjerg, A. t., Kristensen, M., Ritz, C., Stark, K. d., Holst, J. j., Leser, T. d., Wellejus, A., and Astrup, A. (2014). Four weeks supplementation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L. casei W8® shows modest effect on triacylglycerol in young healthy adults. *Benef. Microbes* *6*, 29–39.
- Björkhem, I. (2009). Are side-chain oxidized oxysterols regulators also *in vivo*? *J. Lipid Res.* *50*, S213–S218.
- Bloch, K., and Rittenberg, D. (1942). On the Utilization of Acetic Acid for Cholesterol Formation. *J. Biol. Chem.* *145*, 625–636.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Brauner, R., Johannes, C., Ploessl, F., Bracher, F., and Lorenz, R.L. (2012). Phytosterols reduce cholesterol absorption by inhibition of 27-hydroxycholesterol generation, liver X receptor α activation, and expression of the basolateral sterol exporter ATP-binding cassette A1 in Caco-2 enterocytes. *J. Nutr.* *142*, 981–989.
- Bron, P.A., Molenaar, D., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (2006). DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* *100*, 728–738.

- Bron, P.A., Tomita, S., Mercenier, A., and Kleerebezem, M. (2013). Cell surface-associated compounds of probiotic lactobacilli sustain the strain-specificity dogma. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 262–269.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* *89*, 331–340.
- Brown, J.M., Rudel, L.L., and Yu, L. (2007). NPC1L1 (Niemann–Pick C1-like 1) mediates sterol-specific unidirectional transport of non-esterified cholesterol in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Biochem. J.* *406*, 273.
- Brunham, L.R., Kruit, J.K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J.M., Pape, T.D., Coburn, B.A., Bissada, N., Staels, B., Groen, A.K., et al. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* *116*, 1052–1062.
- Buhaescu, I., and Izzedine, H. (2007). Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. *Clin. Biochem.* *40*, 575–584.
- Bura, K.S., Lord, C., Marshall, S., McDaniel, A., Thomas, G., Warriar, M., Zhang, J., Davis, M.A., Sawyer, J.K., Shah, R., et al. (2013). Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice. *J. Lipid Res.* *54*, 1567–1577.
- Burns, P., Sánchez, B., Vinderola, G., Ruas-Madiedo, P., Ruiz, L., Margolles, A., Reinheimer, J., and de los Reyes-Gavilán, C.G. (2010). Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *Int. J. Food Microbiol.* *142*, 132–141.
- Cheng, H.H., and Lai, M.H. (2000). Fermentation of Resistant Rice Starch Produces Propionate Reducing Serum and Hepatic Cholesterol in Rats. *J. Nutr.* *130*, 1991–1995.
- Chiang, Y.R., Ismail, W., Heintz, D., Schaeffer, C., Dorselaer, A.V., and Fuchs, G. (2008). Study of Anoxic and Oxidic Cholesterol Metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *J. Bacteriol.* *190*, 905–914.
- Choi, E.A., and Chang, H.C. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT - Food Sci. Technol.* *62*, 210–217.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156–159.
- Chou, L.S., and Weimer, B. (1999). Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*1. *J. Dairy Sci.* *82*, 23–31.

- Chu, B.B., Ge, L., Xie, C., Zhao, Y., Miao, H.H., Wang, J., Li, B.-L., and Song, B.-L. (2009). Requirement of Myosin Vb-Rab11a-Rab11-FIP2 Complex in Cholesterol-regulated Translocation of NPC1L1 to the Cell Surface. *J. Biol. Chem.* *284*, 22481–22490.
- Chung, B.H., Liang, P., Doran, S., Cho, B.H.S., and Franklin, F. (2004). Postprandial chylomicrons potent vehicles for transporting cholesterol from endogenous LDL+HDL and cell membranes to the liver via LCAT and CETP. *J. Lipid Res.* *45*, 1242–1255.
- Cohen, D.E. (2008). Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Lipidol.* *2*, S1–S3.
- Colina-Coca, C., Rodríguez-Alcalá, L.M., Fontecha, J., González-Peña, D., de Ancos, B., and Sánchez-Moreno, C. (2014). Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. *Food Res. Int.* *64*, 546–552.
- Cooper, A.D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* *38*, 2173–2192.
- Csont, T., Balogh, G., Csonka, C., Boros, I., Horváth, I., Vigh, L., and Ferdinandy, P. (2002). Hyperlipidemia Induced by High Cholesterol Diet Inhibits Heat Shock Response in Rat Hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 1535–1538.
- Dambekodi, P.C., and Gilliland, S.E. (1998). Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* *81*, 1818–1824.
- Davidson, M.H. (2011). Therapies Targeting Exogenous Cholesterol Uptake: New Insights and Controversies. *Curr. Atheroscler. Rep.* *13*, 95–100.
- Davies, J.P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A., and Ioannou, Y.A. (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* *280*, 12710–12720.
- Davis, H.R., and Altmann, S.W. (2009). Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1791*, 679–683.
- Davis, H.R., Zhu, L.J., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S.P.N., Lam, M.H., Lund, E.G., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) Is the Intestinal Phytosterol and Cholesterol Transporter and a Key Modulator of Whole-body Cholesterol Homeostasis. *J. Biol. Chem.* *279*, 33586–33592.
- DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., Li, W.P., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Espenshade, P.J. (1999). Transport-Dependent Proteolysis of SREBP. *Cell* *99*, 703–712.
- Denizot, F., and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* *89*, 271–277.

- De Rodas, B.Z., Gilliland, S.E., and Maxwell, C.V. (1996). Hypocholesterolemic Action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and Calcium in Swine with Hypercholesterolemia Induced by Diet1. *J. Dairy Sci.* 79, 2121–2128.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., et al. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 6025–6030.
- Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Rodríguez, J.M., Xaus, J., and Olivares, M. (2007). Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J. Appl. Microbiol.* 102, 337–343.
- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004). Thematic review series: Brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., and Spady, D.K. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.* 34, 1637–1659.
- Dijkers, A., and Tietge, U.J. (2010). Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World J. Gastroenterol.* WJG 16, 5936–5945.
- Drew, B.G., Rye, K.A., Duffy, S.J., Barter, P., and Kingwell, B.A. (2012). The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 237–245.
- Duary, R.K., Batish, V.K., and Grover, S. (2011). Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro gut conditions. *Mol. Biol. Rep.* 39, 2541–2552.
- EFSA, European Food Safety Authority (EFSA; 2012). http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3020.pdf
- Everett, B.M., Smith, R.J., and Hiatt, W.R. (2015). Reducing LDL with PCSK9 inhibitors—the clinical benefit of lipid drugs. *N. Engl. J. Med.* 373, 1588–1591.
- Faust, P.L., and Kovacs, W.J. (2014). Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. *Biochimie* 98, 75–85.
- Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.).

- Feng, D., Ohlsson, L., and Duan, R.-D. (2010). Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids Health Dis.* 9, 40.
- Field, F.J., and Mathur, S.N. (1983). beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *Lipid Res.* 24, 409–417.
- Field, F.J., Born, E., and Mathur, S.N. (1997). Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J. Lipid Res.* 38, 348–360.
- Field, F.J., Watt, K., and Mathur, S.N. (2007). Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J. Lipid Res.* 48, 1735–1745.
- FAO, Food and Agriculture Organization (FAO/2002). <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>.
- Frias, M.J., Melo-Cristino, J., and Ramirez, M. (2013). Export of the pneumococcal phage SV1 lysin requires choline-containing teichoic acids and is holin-independent. *Mol. Microbiol.* 87, 430–445.
- Gabbi, C., Warner, M., and Gustafsson, J.Å. (2014). Action mechanisms of Liver X Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 647–650.
- Gallo, L.L., Clark, S.B., Myers, S., and Vahouny, G.V. (1984). Cholesterol absorption in rat intestine: role of cholesterol esterase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* 25, 604–612.
- Garcia-Calvo, M., Lisnock, J., Bull, H.G., Hawes, B.E., Burnett, D.A., Braun, M.P., Crona, J.H., Davis, H.R., Dean, D.C., Detmers, P.A., et al. (2005). The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8132–8137.
- Ge, L., Wang, J., Qi, W., Miao, H.H., Cao, J., Qu, Y.X., Li, B.-L., and Song, B.L. (2008). The Cholesterol Absorption Inhibitor Ezetimibe Acts by Blocking the Sterol-Induced Internalization of NPC1L1. *Cell Metab.* 7, 508–519.
- Gérard, P., Béguet, F., Lepercq, P., Rigottier-Gois, L., Rochet, V., Andrieux, C., and Juste, C. (2004). Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 337–343.
- Gérard, P., Lepercq, P., Leclerc, M., Gavini, F., Raibaud, P., and Juste, C. (2007). *Bacteroides* sp. Strain D8, the First Cholesterol-Reducing Bacterium Isolated from Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5742–5749.
- Gill, S., Stevenson, J., Kristiana, I., and Brown, A.J. (2011). Cholesterol-Dependent Degradation of Squalene Monooxygenase, a Control Point in Cholesterol Synthesis beyond HMG-CoA Reductase. *Cell Metab.* 13, 260–273.

- Gilliland, S.E., Nelson, C.R., and Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *49*, 377–381.
- Gimpl, G., and Gehrig-Burger, K. (2007). Cholesterol Reporter Molecules. *Biosci. Rep.* *27*, 335–358.
- Gimpl, G., and Gehrig-Burger, K. (2011). Probes for studying cholesterol binding and cell biology. *Steroids* *76*, 216–231.
- Goedeke, L., and Fernández-Hernando, C. (2011). Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 915–930.
- Goff, D.C., Bertoni, A.G., Kramer, H., Bonds, D., Blumenthal, R.S., Tsai, M.Y., and Psaty, B.M. (2006). Dyslipidemia Prevalence, Treatment, and Control in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) Gender, Ethnicity, and Coronary Artery Calcium. *Circulation* *113*, 647–656.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell* *124*, 35–46.
- Gomes, A.M.P., and Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* *10*, 139–157.
- Gong, Y., Lee, J.N., Lee, P.C.W., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* *3*, 15–24.
- Gordon, D.A., and Jamil, H. (2000). Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1486*, 72–83.
- Grill, J. P., Cayuela, C., Antoine, J. M., and Schneider, F. (2000). Isolation and characterization of a *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: relation between activity and bile salt resistance. *J. Appl. Microbiol.* *89*, 553–563.
- Groen, A.K., Bloks, V.W., Bandsma, R.H.J., Ottenhoff, R., Chimini, G., and Kuipers, F. (2001). Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in Abca1-null mice lacking HDL. *J. Clin. Invest.* *108*, 843–850.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., and Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* *82*, 187–216.
- Guerciolini, R. (1997). Mode of action of orlistat. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *21 Suppl 3*, S12–S23.

- Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H.N., Ellegård, L., Jessup, W., Jones, P.J., Lütjohann, D., Maerz, W., Masana, L., et al. (2014). Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 232, 346–360.
- Hamada, T., Ikeda, I., Takashima, K., Kobayashi, M., Kodama, Y., Inoue, T., Matsuoka, R., and Imaizumi, K. (2005). Hydrolysis of micellar phosphatidylcholine accelerates cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1726–1732.
- Hannaoui, S., Shim, S.Y., Cheng, Y.C., Corda, E., and Gilch, S. (2014). Cholesterol Balance in Prion Diseases and Alzheimer’s Disease. *Viruses* 6, 4505–4535.
- Havel, R.J. (1984). The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J. Lipid Res.* 25, 1570–1576.
- van Heek, M., Farley, C., Compton, D.S., Hoos, L., and Davis, H.R. (2001). Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function. *Br. J. Pharmacol.* 134, 409–417.
- Heng, S., Tieu, W., Hautmann, S., Kuan, K., Pedersen, D.S., Pietsch, M., Gütschow, M., and Abell, A.D. (2011). New cholesterol esterase inhibitors based on rhodanine and thiazolidinedione scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 7453–7463.
- Herrema, H., Meissner, M., van Dijk, T.H., Brufau, G., Boverhof, R., Oosterveer, M.H., Reijngoud, D.-J., Müller, M., Stellaard, F., Groen, A.K., et al. (2010). Bile salt sequestration induces hepatic de novo lipogenesis through farnesoid X receptor– and liver X receptor–controlled metabolic pathways in mice. *Hepatology* 51, 806–816.
- Hojjer, M.A., Melief, M.J., Helden-Meeuwsen, C.G. van, Eulderink, F., and Hazenberg, M.P. (1995). Detection of muramic acid in a carbohydrate fraction of human spleen. *Infect. Immun.* 63, 1652–1657.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131.
- Hossain, T., Riad, A., Siddiqi, S., Parthasarathy, S., and Siddiqi, S.A. (2014). Mature VLDL triggers the biogenesis of a distinct vesicle from the trans-Golgi network for its export to the plasma membrane. *Biochem. J.* 459, 47–58.
- Hu, X., Wang, T., Li, W., Jin, F., and Wang, L. (2013). Effects of NS lactobacillus strains on lipid metabolism of rats fed a high-cholesterol diet. *Lipids Health Dis.* 12, 67.

- Huang, Y., and Zheng, Y. (2010). The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* *103*, 473.
- Huang, W.C., Chen, Y.M., Kan, N.W., Ho, C.S., Wei, L., Chan, C.H., Huang, H.Y., and Huang, C.C. (2015). Hypolipidemic Effects and Safety of *Lactobacillus reuteri* 263 in a Hamster Model of Hyperlipidemia. *Nutrients* *7*, 3767–3782.
- Huang, Y., Wang, J., Quan, G., Wang, X., Yang, L., and Zhong, L. (2014). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 prevents atherosclerosis via inhibition of intestinal cholesterol absorption in apolipoprotein E-knockout mice. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 7496–7504.
- Huggins, D.J., Venkitaraman, A.R., and Spring, D.R. (2011). Rational Methods for the Selection of Diverse Screening Compounds. *ACS Chem. Biol.* *6*, 208–217.
- Hussain, M.M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* *25*, 200–206.
- Ikeda, I., and Sugano, M. (1983). Some aspects of mechanism of inhibition of cholesterol absorption by β -sitosterol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *732*, 651–658.
- Ikeda, I., Matsuoka, R., Hamada, T., Mitsui, K., Imabayashi, S., Uchino, A., Sato, M., Kuwano, E., Itamura, T., Yamada, K., et al. (2002). Cholesterol esterase accelerates intestinal cholesterol absorption. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* *1571*, 34–44.
- Ikeda, I., Kobayashi, M., Hamada, T., Tsuda, K., Goto, H., Imaizumi, K., Nozawa, A., Sugimoto, A., and Kakuda, T. (2003). Heat-epimerized tea catechins rich in gallocatechin gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins rich in epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *J. Agric. Food Chem.* *51*, 7303–7307.
- Infante, R.E., Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 15287–15292.
- Iqbal, J., and Hussain, M.M. (2009). Intestinal lipid absorption. *AJP Endocrinol. Metab.* *296*, E1183–E1194.
- Iyer, S.P.N., Yao, X., Crona, J.H., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Davis Jr., H.R., Graziano, M.P., and Altmann, S.W. (2005). Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1722*, 282–292.
- Jakulj, L., Vissers, M.N., van Roomen, C.P., van der Veen, J.N., Vrans, C.L.J., Kunne, C., Stellaard, F., Kastelein, J.J.P., and Groen, A.K. (2010). Ezetimibe stimulates faecal

- neutral sterol excretion depending on *abcg8* function in mice. *FEBS Lett.* *584*, 3625–3628.
- Javitt, N.B. (1994). Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. *FASEB J.* *8*, 1308–1311.
- Jensen, G.S., Benson, K.F., Carter, S.G., and Endres, J.R. (2010). GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC Immunol.* *11*, 15.
- Jesch, E.D., and Carr, T.P. (2006). Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutr. Res.* *26*, 579–584.
- Jeun, J., Kim, S., Cho, S.Y., Jun, H., Park, H.J., Seo, J.-G., Chung, M.J., and Lee, S.J. (2010). Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition* *26*, 321–330.
- John, S., Thangapandian, S., Lazar, P., Son, M., Park, C., and Lee, K.W. (2013). New insights in the activation of human cholesterol esterase to design potent anti-cholesterol drugs. *Mol. Divers.* *18*, 119–131.
- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* *1529*, 245–256.
- Joris, I., Zand, T., Nunnari, J.J., Krolikowski, F.J., and Majno, G. (1983). Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. *Am. J. Pathol.* *113*, 341–358.
- Kaneko, E., Matsuda, M., Yamada, Y., Tachibana, Y., Shimomura, I., and Makishima, M. (2003). Induction of Intestinal ATP-binding Cassette Transporters by a Phytosterol-derived Liver X Receptor Agonist. *J. Biol. Chem.* *278*, 36091–36098.
- Kapourchali, F.R. (2014). Animal models of atherosclerosis. *World J. Clin. Cases* *2*, 126.
- Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1841*, 919–933.
- Khani, S., M. Hosseini, H., Taheri, M., R. Nourani, M., and A. Imani Fooladi, A. (2012). Probiotics as an Alternative Strategy for Prevention and Treatment of Human Diseases: A Review. *Inflamm. Allergy - Drug Targets Former. Curr. Drug Targets* *11*, 79–89.
- Kheiriloomoo, A., and Ferrara, K.W. (2007). Cholesterol transport from liposomal delivery vehicles. *Biomaterials* *28*, 4311–4320.
- Kim, A., Chiu, A., Barone, M.K., Avino, D., Wang, F., Coleman, C.I., and Phung, O.J. (2011). Green Tea Catechins Decrease Total and Low-Density Lipoprotein Cholesterol: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Diet. Assoc.* *111*, 1720–1729.

- Kimoto, H., Ohmomo, S., and Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by lactococci. *J. Dairy Sci.* *85*, 3182–3188.
- Kirana, C., Rogers, P.F., Bennett, L.E., Abeywardena, M.Y., and Patten, G.S. (2005). Naturally derived micelles for rapid in vitro screening of potential cholesterol-lowering bioactives. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 4623–4627.
- Klaver, F.A., and van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 1120–1124.
- Kobayashi, M., Nishizawa, M., Inoue, N., Hosoya, T., Yoshida, M., Ukawa, Y., Sagesaka, Y.M., Doi, T., Nakayama, T., Kumazawa, S., et al. (2014). Epigallocatechin Gal late Decreases the Micellar Solubility of Cholesterol via Specific Interaction with Phosphatidylcholine. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 2881–2890.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C.M., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., et al. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19474–19479.
- Kramer, W., Girbig, F., Corsiero, D., Pfenninger, A., Frick, W., Jahne, G., Rhein, M., Wendler, W., Lottspeich, F., Hochleitner, E.O., et al. (2005). Aminopeptidase N (CD13) Is a Molecular Target of the Cholesterol Absorption Inhibitor Ezetimibe in the Enterocyte Brush Border Membrane. *J. Biol. Chem.* *280*, 1306–1320.
- Kris-Etherton, P.M., and Dietschy, J. (1997). Design criteria for studies examining individual fatty acid effects on cardiovascular disease risk factors: human and animal studies. *Am. J. Clin. Nutr.* *65*, 1590S – 1596S.
- Kruit, J.K., Plösch, T., Havinga, R., Boverhof, R., Groot, P.H.E., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2005). Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* *128*, 147–156.
- Kubitz, R., Dröge, C., Stindt, J., Weissenberger, K., and Häussinger, D. (2012). The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* *36*, 536–553.
- Kumar, V. (2010). Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional (Elsevier España).
- Kumar, A., Kumar, M., Ghosh, M., and Ganguli, A. (2013a). Modeling *in vitro* cholesterol reduction in relation to growth of probiotic *Lactobacillus casei*: Modeling *in vitro* cholesterol reduction. *Microbiol. Immunol.* *57*, 100–110.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., et al. (2012). Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. *Exp. Diabetes Res.* *2012*, 1–14.

- Kumar, M., Rakesh, S., Nagpal, R., Hemalatha, R., Ramakrishna, A., Sudarshan, V., Ramagoni, R., Shujauddin, M., Verma, V., Kumar, A., et al. (2013b). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 29, 574–579.
- Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K., and Yokota, A. (2006). Mechanism of Growth Inhibition by Free Bile Acids in Lactobacilli and Bifidobacteria. *J. Bacteriol.* 188, 1979–1986.
- Lahti, L., Salonen, A., Kekkonen, R.A., Salojärvi, J., Jalanka-Tuovinen, J., Palva, A., Orešič, M., and de Vos, W.M. (2013). Associations between the human intestinal microbiota, *Lactobacillus rhamnosus* GG and serum lipids indicated by integrated analysis of high-throughput profiling data. *PeerJ* 1, e32.
- Lai, M.J., Lin, N.T., Hu, A., Soo, P.C., Chen, L.K., Chen, L.H., and Chang, K.C. (2011). Antibacterial activity of Acinetobacter baumannii phage Phi AB2 endolysin (LysAB2) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 529–539.
- Lambert, J.M., Bongers, R.S., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (2008). Functional Analysis of Four Bile Salt Hydrolase and Penicillin Acylase Family Members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4719–4726.
- Lammert, F., and Wang, D.Q.-H. (2005). New Insights Into the Genetic Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Gastroenterology* 129, 718–734.
- Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Martín, R., Delgado, S., Rodríguez, J. m., Olivares, M., and Xaus, J. (2007). Safety assessment of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714. *J. Appl. Microbiol.* 103, 175–184.
- Lee, J., and Kaletunc, G. (2002). Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5379–5386.
- Lee, I.-C., Tomita, S., Kleerebezem, M., and Bron, P.A. (2013). The quest for probiotic effector molecules—Unraveling strain specificity at the molecular level. *Pharmacol. Res.* 69, 61–74.
- Lee, K., Rho, B.S., Pi, K., Kim, H.J., and Choi, Y.J. (2011). Proteomic analysis of protein expression in *Lactobacillus plantarum* in response to alkaline stress. *J. Biotechnol.* 153, 1–7.
- Lee, R.G., Willingham, M.C., Davis, M.A., Skinner, K.A., and Rudel, L.L. (2000). Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *J. Lipid Res.* 41, 1991–2001.

- Lee, W.S., Im, K.R., Park, Y.D., Sung, N.D., and Jeong, T.S. (2006). Human ACAT-1 and ACAT-2 Inhibitory Activities of Pentacyclic Triterpenes from the Leaves of *Lycopus lucidus* T<small>URCZ</small>. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 382–384.
- Lee, D.Y., Jeong, T.S., Lyu, H.N., Bang, M.H., Hong, Y.H., Lee, Y.H., and Baek, N.I. (2008). Screening for Human ACAT-1 and ACAT-2 Inhibitory Activity of Edible Plant Extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 16, 341-348
- Lewis, G.F., and Rader, D.J. (2005). New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circ. Res.* 96, 1221–1232.
- Lewis, S.J., and Burmeister, S. (2005). A double-blind placebo-controlled study of the effects of *Lactobacillus acidophilus* on plasma lipids. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59, 776–780.
- Lin, M.Y., and Chen, T.W. (2000). Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. *J. Food Drug Anal.* 8.
- Liong, M.T., and Shah, N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.* 88, 55–66.
- Loessner, M.J. (2005). Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 480–487.
- Lopez, A.M., Posey, K.S., and Turley, S.D. (2014). Deletion of sterol O-acyltransferase 2 (SOAT2) function in mice deficient in lysosomal acid lipase (LAL) dramatically reduces esterified cholesterol sequestration in the small intestine and liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454, 162–166.
- Lundeen, S.G., and Savage, D.C. (1990). Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100. *J. Bacteriol.* 172, 4171–4177.
- Lye, H.S., Kuan, C.Y., Ewe, J.-A., Fung, W.Y., and Liong, M.T. (2009). The Improvement of Hypertension by Probiotics: Effects on Cholesterol, Diabetes, Renin, and Phytoestrogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3755–3775.
- Lye, H.S., Rusul, G., and Liong, M.T. (2010a). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J. Dairy Sci.* 93, 1383–1392.
- Lye, H.-S., Rahmat-Ali, G.R., and Liong, M.-T. (2010b). Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 20, 169–175.
- Lye, H.S., Karim, A.A., Rusul, G., and Liong, M.T. (2011). Electroporation enhances the ability of lactobacilli to remove cholesterol. *J. Dairy Sci.* 94, 4820–4830.

- Lye, H.S., Khoo, B.Y., Karim, A.A., Rusul, G., and Liong, M.T. (2012a). Ultrasound enhanced growth and cholesterol removal of *Lactobacillus fermentum* FTDC 1311 in the parent cells but not the subsequent passages. *Ultrason. Sonochem.* *19*, 901–908.
- Lye, H.S., Alias, K.A., Rusul, G., and Liong, M.T. (2012b). Ultrasound treatment enhances cholesterol removal ability of lactobacilli. *Ultrason. Sonochem.* *19*, 632–641.
- Madigan, M., Martinko, J., and Parker, J. Brock (2004). *Biología de los Microorganismos* (Pearson Education).
- Mann, G.V., and Spoerry, A. (1974). Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutr.* *27*, 464–469.
- Maron, D.J., Fazio, S., and Linton, M.F. (2000). Current Perspectives on Statins. *Circulation* *101*, 207–213.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., and Rodríguez, J.M. (2005). Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact. Off. J. Int. Lact. Consult. Assoc.* *21*, 8–17; quiz 18–21, 41.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., and Rodríguez, J.M. (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. *Int. J. Food Microbiol.* *112*, 35–43.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., and Ahern, K.G. (2002). *Biochemistry* (3rd Edition) (Addison Wesley Longman, Inc.).
- Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., and Yoshikai, Y. (2003). Lipoteichoic Acids from *Lactobacillus* Strains Elicit Strong Tumor Necrosis Factor Alpha-Inducing Activities in Macrophages through Toll-Like Receptor 2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *10*, 259–266.
- Maxfield, F.R., and van Meer, G. (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 422–429.
- May, C.L., Berger, J.M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., Hussain, M.M., Collet, X., Cariou, B., and Costet, P. (2013). Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1484–1493.
- Mead, J.F., Alfin-Slater, R.B., Howton, D.R., and Popják, G. (1986). *Lipids* (Springer US).
- Melchior, D.L., and Rottem, S. (1981). The Organization of Cholesterol Esters in Membranes of *Mycoplasma capricolum*. *Eur. J. Biochem.* *117*, 147–153.

- Melnikov, S.M., Seijen ten Hoorn, J.W., and Eijkelenboom, A.P.A. (2004). Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: an in vitro study. *Chem. Phys. Lipids* 127, 121–141.
- Millán, J., Pintó, X., Muñoz, A., Zúñiga, M., Rubiés-Prat, J., Pallardo, L.F., Masana, L., Mangas, A., Hernández-Mijares, A., González-Santos, P., et al. (2009). Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc. Health Risk Manag.* 5, 757–765.
- Miremadi, F., Ayyash, M., Sherkat, F., and Stojanovska, L. (2014). Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *J. Funct. Foods* 9, 295–305.
- Moghadasian, M.H. (2002). Experimental atherosclerosis: A historical overview. *Life Sci.* 70, 855–865.
- Monte, M.J., Marin, J.J., Antelo, A., and Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* WJG 15, 804–816.
- Moore, K.J., Rayner, K.J., Suárez, Y., and Fernández-Hernando, C. (2010). microRNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 699–706.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- da Motta, N.A.V., Kümmerle, A.E., Marostica, E., dos Santos, C.F., Fraga, C.A.M., Barreiro, E.J., de Miranda, A.L.P., and de Brito, F.C.F. (2013). Anti-atherogenic Effects of a New Thienylacylhydrazone Derivative, LASSBio-788, in Rats Fed a Hypercholesterolemic Diet. *J. Pharmacol. Sci.* 123, 47–57.
- Mou, S., Ding, X., and Liu, Y. (2002). Separation methods for taurine analysis in biological samples. *J. Chromatogr. B* 781, 251–267.
- Narushima, K., Takada, T., Yamanashi, Y., and Suzuki, H. (2008). Niemann-Pick C1-Like 1 Mediates α -Tocopherol Transport. *Mol. Pharmacol.* 74, 42–49.
- Naruszewicz, M., Johansson, M.L., Zapolska-Downar, D., and Bukowska, H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1249–1255.
- Nauli, A.M., Nassir, F., Zheng, S., Yang, Q., Lo, C.M., Vonlehmden, S.B., Lee, D., Jandacek, R.J., Abumrad, N.A., and Tso, P. (2006). CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 131, 1197–1207.
- Nekohashi, M., Ogawa, M., Ogihara, T., Nakazawa, K., Kato, H., Misaka, T., Abe, K., and Kobayashi, S. (2014). Luteolin and Quercetin Affect the Cholesterol Absorption

- Mediated by Epithelial Cholesterol Transporter Niemann–Pick C1-Like 1 in Caco-2 Cells and Rats. *PLoS ONE* 9, e97901.
- Ness, G.C., Zhao, Z., and Wiggins, L. (1994). Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels. *J. Biol. Chem.* 269, 29168–29172.
- Nestruck, A.C., and Rubinstein, D. (1976). The synthesis of apoproteins of very low density lipoproteins isolated from the Golgi apparatus of rat liver. *Can. J. Biochem.* 54, 617–628.
- Nguyen, T.D.T., Kang, J.H., and Lee, M.S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 358–361.
- Nofer, J.R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., and Eckardstein, A. von (2002). HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 161, 1–16.
- Noh, D.O., Kim, S.H., and Gilliland, S.E. (1997). Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.* 80, 3107–3113.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J.A., Martín, R., Rodríguez, J.M., and Xaus, J. (2006). The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. *Int. Microbiol.* 9, 47–52.
- Oliveira, H., Melo, L.D.R., Santos, S.B., Nobrega, F.L., Ferreira, E.C., Cerca, N., Azeredo, J., and Kluskens, L.D. (2013). Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. *J. Virol.* 87, 4558–4570.
- Onyeike, E.N., Monanu, M.O., and Okoye, C.N. (2012). Changes in the blood lipid profile of wistar albino rats fed rich cholesterol diet. *Ann. Biol. Res.* 3, 5186–5191.
- Ooi, L.G., and Liong, M.T. (2010). Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2499–2522.
- Otero, M.C., and Nader-Macías, M.E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 35–46.
- Ouwehand, A.C., and Salminen, S.J. (1998). The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-viable Bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 749–758.
- Ouwehand, A.C., Tölkö, S., Kulmala, J., Salminen, S., and Salminen, E. (2000). Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 82–86.

- Palmgrén, J.J., Töyräs, A., Mauriala, T., Mönkkönen, J., and Auriola, S. (2005). Quantitative determination of cholesterol, sitosterol, and sitostanol in cultured Caco-2 cells by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 821, 144–152.
- Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Skoumas, J., Chrysohoou, C., Toutouza, M., Stefanadis, C.I., and Toutouzias, P.K. (2003). Importance of LDL/HDL cholesterol ratio as a predictor for coronary heart disease events in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a 15-year follow-up (1987-2002). *Curr. Med. Res. Opin.* 19, 89–94.
- Park, D.Y., Ahn, Y.T., Huh, C.S., McGregor, R.A., and Choi, M.S. (2013). Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome. *World J. Gastroenterol.* WJG 19, 274–283.
- Parolini, C., Rigamonti, E., Marchesi, M., Busnelli, M., Cinquanta, P., Manzini, S., Sirtori, C.R., and Chiesa, G. (2012). Cholesterol-lowering effect of dietary *Lupinus angustifolius* proteins in adult rats through regulation of genes involved in cholesterol homeostasis. *Food Chem.* 132, 1475–1479.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., and Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1171–1185.
- Patel, J., Sheehan, V., and Gurk-Turner, C. (2003). Ezetimibe (Zetia): a new type of lipid-lowering agent. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* 16, 354–358.
- Pearse, B.M., Smith, C.J., and Owen, D.J. (2000). Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 220–228.
- Pereira, D.I.A., and Gibson, G.R. (2002). Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4689–4693.
- Pereira, D.I.A., McCartney, A.L., and Gibson, G.R. (2003). An In Vitro Study of the Probiotic Potential of a Bile-Salt-Hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* Strain, and Determination of Its Cholesterol-Lowering Properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4743–4752.
- Pertierra, A.G., Olmo, R., Aznar, C.C., and López, C.T. (2001). *Bioquímica metabólica* (Editorial Tebar).
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pinto, M., Robineleon, S., Appay, M., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simonassmann, P., Haffen, K., Fogh, J., et al. (1983). Enterocyte-Like Differentiation

- and Polarization of the Human-Colon Carcinoma Cell-Line Caco-2 in Culture. *Biol. Cell* 47, 323–330.
- Poklar Ulrih, N., Ota, A., Šentjurc, M., Kure, S., and Abram, V. (2010). Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chem.* 121, 78–84.
- Pramfalk, C., Jiang, Z.Y., Cai, Q., Hu, H., Zhang, S.-D., Han, T.Q., Eriksson, M., and Parini, P. (2010). HNF1alpha and SREBP2 are important regulators of NPC1L1 in human liver. *J. Lipid Res.* 51, 1354–1362.
- Prasanna, P.H.P., Grandison, A.S., and Charalampopoulos, D. (2014). Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Res. Int.* 55, 247–262.
- Presti, I., D’Orazio, G., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Giardina, S., Michelotti, A., Tursi, F., Vassallo, M., et al. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5613–5626.
- Qin, L., Yang, Y., Yang, Y., Zhu, N., Gong, Y., Zhang, C., Li, S., and Liao, D. (2014). Ezetimibe suppresses cholesterol accumulation in lipid-loaded vascular smooth muscle cells in vitro via MAPK signaling. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 1129–1136.
- Quistad, G.B., Liang, S.N., Fisher, K.J., Nomura, D.K., and Casida, J.E. (2006). Each Lipase Has a Unique Sensitivity Profile for Organophosphorus Inhibitors. *Toxicol. Sci.* 91, 166–172.
- Rader, D.J. (2009). Lecithin: Cholesterol Acyltransferase and Atherosclerosis. *Circulation* 120, 549–552.
- Raederstorff, D.G., Schlachter, M.F., Elste, V., and Weber, P. (2003). Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J. Nutr. Biochem.* 14, 326–332.
- Rajkumar, H., Mahmood, N., Kumar, M., Varikuti, S.R., Challa, H.R., and Myakala, S.P. (2014). Effect of Probiotic (VSL#3) and Omega-3 on Lipid Profile, Insulin Sensitivity, Inflammatory Markers, and Gut Colonization in Overweight Adults: A Randomized, Controlled Trial. *Mediators Inflamm* 2014.
- Ranasinghe, J., Silva, S., and Herath, N. (2013). Changes of Serum Lipids and Proteins during Probiotics Feeding and Its Exposure. *IJSRP* 3.
- Raper, A., Kolansky, D.M., Sachais, B.S., Meagher, E.A., Baer, A.L., and Cuchel, M. (2015). Long-term clinical results of microsomal triglyceride transfer protein inhibitor use in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol.* 9, 107–112.

- Rašić, J.L., Vujičić, I.F., Škrinjar, M., and Vulić, M. (1992). Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* *14*, 39–44.
- Razin, S. (1975). Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J. Bacteriol.* *124*, 570–572.
- Remagni, M.C., Paladino, M., Locci, F., Romeo, F.V., Zago, M., Povolo, M., Contarini, G., and Carminati, D. (2013). Cholesterol removal capability of lactic acid bacteria and related cell membrane fatty acid modifications. *Folia Microbiol. (Praha)* *58*, 443–449.
- Repa, J.J., Buhman, K.K., Farese, R.V., Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004). ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: Impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology* *40*, 1088–1097.
- Rice, K.C., and Bayles, K.W. (2008). Molecular Control of Bacterial Death and Lysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *72*, 85–109.
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Vezza, T., Garrido-Mesa, N., Olivares, M., Comalada, M., Riccardi, C., Utrilla, M.P., Rodríguez-Cabezas, M.E., and Galvez, J. (2015). The viability of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 is not essential to exert intestinal anti-inflammatory properties. *Food Funct.* *6*, 1176–84.
- Rodwell, V.W., Nordstrom, J.L., and Mitschelen, J.J. (1976). Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* *14*, 1–74.
- Ros, E. (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* *151*, 357–379.
- Rousset, M. (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* *68*, 1035–1040.
- Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., and Sánchez, B. (2011). How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes Nutr.* *6*, 307–318.
- Ruiz, L., O’Connell-Motherway, M., Zomer, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., and van Sinderen, D. (2012). A bile-inducible membrane protein mediates bifidobacterial bile resistance. *Microb. Biotechnol.* *5*, 523–535.
- Russell, D.W. (2009). Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J. Lipid Res.* *50*, S120–S125.
- Saddar, S., Carriere, V., Lee, W.-R., Tanigaki, K., Yuhanna, I.S., Parathath, S., Morel, E., Warriar, M., Sawyer, J.K., Gerard, R.D., et al. (2013). Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) is a Plasma Membrane Cholesterol Sensor. *Circ. Res.* *112*, 140–151.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1987). *Molecular cloning : a laboratory manual*.
- Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., and Margolles, A. (2012). Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends Food Sci. Technol.* *26*, 56–63.
- Sane, A.T. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J. Lipid Res.* *47*, 2112–2120.
- Sañudo, A.I., Sempere, L., Rodríguez-Nogales, A., Duarte, J., Olivares, M., and Bañuelos, O. (2016). Improving the Functional Diversity of a Library of Live and Inactivated Probiotic Microorganisms. *Int. J. Probiotics Prebiotics En prensa*.
- Scholz-Ahrens, K.E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açil, Y., Glüer, C.C., and Schrezenmeir, J. (2007). Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J. Nutr.* *137*, 838S – 46S.
- Seo, H.S., and Choi, M.H. (2015). Cholesterol homeostasis in cardiovascular disease and recent advances in measuring cholesterol signatures. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *153*, 72–79.
- Shaper, A.G., Jones, K.W., Jones, M., and Kyobe, J. (1963). Serum Lipids in Three Nomadic Tribes of Northern Kenya. *Am. J. Clin. Nutr.* *13*, 135–146.
- Simons, L.A., Amansec, S.G., and Conway, P. (2006). Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* *16*, 531–535.
- Smet, I.D., Hoorde, L.V., Saeyer, N.D., Woestyne, M.V., and Verstraete, W. (1994). In Vitro Study of Bile Salt Hydrolase (BSH) Activity of BSH Isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 Strains and Estimation of Cholesterol Lowering through Enhanced BSH Activity. *Microb. Ecol. Health Dis.* *7*.
- Song, B.L., Javitt, N.B., and DeBose-Boyd, R.A. (2005). Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* *1*, 179–189.
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., and Mikelsaar, M. (2004). A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *J. Dairy Sci.* *87*, 2017–2023.
- Soroka, C.J., and Boyer, J.L. (2014). Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: Therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol. Aspects Med.* *37*, 3–14.
- Sparrow, C.P., Patel, S., Baffic, J., Chao, Y.S., Hernandez, M., Lam, M.-H., Montenegro, J., Wright, S.D., and Detmers, P.A. (1999). A fluorescent cholesterol analog traces

- cholesterol absorption in hamsters and is esterified *in vivo* and *in vitro*. *J. Lipid Res.* **40**, 1747–1757.
- Staels, B., Handelsman, Y., and Fonseca, V. (2010). Bile Acid Sequestrants for Lipid and Glucose Control. *Curr. Diab. Rep.* **10**, 70–77.
- Stout, J.S., Sutton, L.D., and Quinn, D.M. (1985). Acylenzyme mechanism and solvent isotope effects for cholesterol esterase-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate. *Biochim. Biophys. Acta* **837**, 6–12.
- Suckling, K.E., Benson, G.M., Bond, B., Gee, A., Glen, A., Haynes, C., and Jackson, B. (1991). Cholesterol lowering and bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment. *Atherosclerosis* **89**, 183–190.
- Sudhop, T., Lütjohann, D., Kodal, A., Igel, M., Tribble, D.L., Shah, S., Perevozskaya, I., and Bergmann, K. von (2002). Inhibition of Intestinal Cholesterol Absorption by Ezetimibe in Humans. *Circulation* **106**, 1943–1948.
- Sudhop, T., Reber, M., Tribble, D., Sapre, A., Taggart, W., Gibbons, P., Musliner, T., Bergmann, K. von, and Lütjohann, D. (2009). Changes in cholesterol absorption and cholesterol synthesis caused by ezetimibe and/or simvastatin in men. *J. Lipid Res.* **50**, 2117–2123.
- Tabas, I. (2002). Cholesterol in health and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 583–590.
- Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J., and Schneider, F. (1995). Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 149–151.
- Tahri, K., Grille, J.P., and Schneider, F. (1996). Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr. Microbiol.* **33**, 187–193.
- Taranto, M.P., Sesma, F., Holgado, A.P. de R., and Valdez, G.F. de (1997). Bile salts hydrolase plays a key role on cholesterol removal by *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Lett.* **19**, 845–847.
- Taranto, M.P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A.P., and Valdez, G.F. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J. Dairy Sci.* **81**, 2336–2340.
- Taranto, M.P., Fernandez Murga, M.L., Lorca, G., and Valdez, G. de (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 86–91.
- Taverniti, V., and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* **6**, 261–274.

- Temel, R.E., Gebre, A.K., Parks, J.S., and Rudel, L.L. (2003). Compared with Acyl-CoA:Cholesterol O-Acyltransferase (ACAT) 1 and Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, ACAT2 Displays the Greatest Capacity to Differentiate Cholesterol from Sitosterol. *J. Biol. Chem.* *278*, 47594–47601.
- Temel, R.E., Tang, W., Ma, Y., Rudel, L.L., Willingham, M.C., Ioannou, Y.A., Davies, J.P., Nilsson, L.M., and Yu, L. (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J. Clin. Invest.* *117*, 1968–1978.
- Thiruchenduran, M., Vijayan, N.A., Sawaminathan, J.K., and Devaraj, S.N. (2011). Protective effect of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Cardiovasc. Pathol.* *20*, 361–368.
- Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M.L., Shah, D., Jain, P., Saha, S., and Prakash, S. (2014). Cholesterol Assimilation by *Lactobacillus* Probiotic Bacteria: An *In Vitro* Investigation. *BioMed Res. Int.* *2014*, e380316.
- Tsai, C.C., Lin, P.P., Hsieh, Y.M., Zhang, Z., Wu, H.C., and Huang, C.C. (2014). Cholesterol-Lowering Potentials of Lactic Acid Bacteria Based on Bile-Salt Hydrolase Activity and Effect of Potent Strains on Cholesterol Metabolism *In Vitro* and *In Vivo*. *Sci. World J.* *2014*, 1–10.
- Tsui-Pierchala, B.A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E.M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* *25*, 412–417.
- Tu, H., Okamoto, A.Y., and Shan, B. (2000). FXR, a Bile Acid Receptor and Biological Sensor. *Trends Cardiovasc. Med.* *10*, 30–35.
- Turley, S.D. (2008). The role of Niemann-Pick C1 – Like 1 (NPC1L1) in intestinal sterol absorption. *J. Clin. Lipidol.* *2*, S20–S28.
- Uehara, T., and Bernhardt, T.G. (2011). More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Curr. Opin. Microbiol.* *14*, 698–703.
- Uehara, Y., and Saku, K. (2014). High-density lipoprotein and atherosclerosis: Roles of lipid transporters. *World J. Cardiol.* *6*, 1049–1059.
- Uittenbogaard, A., Everson, W.V., Matveev, S.V., and Smart, E.J. (2002). Cholesteryl Ester Is Transported from Caveolae to Internal Membranes as Part of a Caveolin-Annexin II Lipid-Protein Complex. *J. Biol. Chem.* *277*, 4925–4931.
- Usman and Hosono, A. (1999). Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci.* *82*, 243–248.

- Valasek, M.A., Weng, J., Shaul, P.W., Anderson, R.G.W., and Repa, J.J. (2005). Caveolin-1 Is Not Required for Murine Intestinal Cholesterol Transport. *J. Biol. Chem.* *280*, 28103–28109.
- Vance, D.E., and Vance, J.E. (1985). *Biochemistry of Lipids and Membranes* (Benjamin-Cummings).
- Veiga, P., Juste, C., Lepercq, P., Saunier, K., Béguet, F., and Gérard, P. (2005). Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol. Lett.* *242*, 81–86.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 259–286.
- Vrins, C.L. (2010). From blood to gut: Direct secretion of cholesterol via transintestinal cholesterol efflux. *World J. Gastroenterol. WJG* *16*, 5953–5957.
- Wang, L.J., and Song, B.L. (2012). Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochim. Biophys. Acta* *1821*, 964–972.
- Wang, L. J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., Menghebilige, and Bao, Q. (2012). 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.* *95*, 1645–1654.
- Wang, S., Noh, S.K., and Koo, S.I. (2006). Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A(2) and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats. *J. Nutr. Biochem.* *17*, 492–498.
- Wasan, K.M., Brocks, D.R., Lee, S.D., Sachs-Barrable, K., and Thornton, S.J. (2008). Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 84–99.
- Wei, Y., Peng, A.-Y., Wang, B., Ma, L., Peng, G., Du, Y., and Tang, J. (2014). Synthesis and biological evaluation of phosphorylated flavonoids as potent and selective inhibitors of cholesterol esterase. *Eur. J. Med. Chem.* *74*, 751–758.
- West, A.M., Anderson, J.D., Meyer, C.H., Epstein, F.H., Wang, H., Hagspiel, K.D., Berr, S.S., Harthun, N.L., DiMaria, J.M., Hunter, J.R., et al. (2011). The effect of ezetimibe on peripheral arterial atherosclerosis depends upon statin use at baseline. *Atherosclerosis* *218*, 156–162.
- White, C.M. (2015). Therapeutic Potential and Critical Analysis of the PCSK9 Monoclonal Antibodies Evolocumab and Alirocumab. *Ann. Pharmacother.* *49*, 1327–1335.
- WHO, World Health Organization. (2009). “Cardiovascular Disease” Fact sheet nº 317, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html>.

- WHO, World Health Organization (2003). "Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases" Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, Geneva, Switzerland.
- Willems, E., Leyns, L., and Vandesompele, J. (2008). Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal. Biochem.* 379, 127–129.
- Wilson, M.D., and Rudel, L.L. (1994). Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J. Lipid Res.* 35, 943–955.
- Wong, C., and Ustunol, Z. (2006). Mode of inactivation of probiotic bacteria affects interleukin 6 and interleukin 8 production in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *J. Food Prot.* 69, 2285–2288.
- Woollett, L.A., Wang, Y., Buckley, D.D., Yao, L., Chin, S., Granholm, N., Jones, P.J.H., Setchell, K.D.R., Tso, P., and Heubi, J.E. (2006). Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans. *Gut* 55, 197–204.
- van der Wulp, M.Y.M., Verkade, H.J., and Groen, A.K. (2013). Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 368, 1–16.
- Xiao, J.Z., Kondo, S., Takahashi, N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S., and Hosono, A. (2003). Effects of Milk Products Fermented by *Bifidobacterium longum* on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers. *J. Dairy Sci.* 86, 2452–2461.
- Yadav, H., Jain, S., and Sinha, P.R. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 23, 62–68.
- Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L., and Treiber, G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40, 734–744.
- Yamanashi, Y., Takada, T., and Suzuki, H. (2006). Niemann-Pick C1-Like 1 Overexpression Facilitates Ezetimibe-Sensitive Cholesterol and beta-Sitosterol Uptake in CaCo-2 Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 559–564.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial Step in Cholesterol Homeostasis: Sterols Promote Binding of SCAP to INSIG-1, a Membrane Protein that Facilitates Retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489–500.
- Yao, L., Heubi, J.E., Buckley, D.D., Fierra, H., Setchell, K.D.R., Granholm, N.A., Tso, P., Hui, D.Y., and Woollett, L.A. (2002). Separation of micelles and vesicles within luminal

- aspirates from healthy humans: solubilization of cholesterol after a meal. *J. Lipid Res.* **43**, 654–660.
- Yeagle, P.L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **822**, 267–287.
- Yoon, H.S., Ju, J.H., Kim, H.N., Park, H.J., Ji, Y., Lee, J.E., Shin, H.K., Do, M.S., and Holzapfel, W. (2013). Reduction in cholesterol absorption in Caco-2 cells through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 by the putative probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and *Lactobacillus plantarum* NR74 from fermented foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **64**, 44–52.
- Young, R. (2014). Phage Lysis: Three Steps, Three Choices, One Outcome. *J. Microbiol.* **52**, 243–258.
- Young, I., Wang, I., and Roof, W.D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* **8**, 120–128.
- Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R.E., Berge, K.E., Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2002a). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J. Clin. Invest.* **110**, 671–680.
- Yu, L., Hammer, R.E., Li-Hawkins, J., Bergmann, K. von, Lutjohann, D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2002b). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16237–16242.
- Yuan, J., Wang, B., Sun, Z., Bo, X., Yuan, X., He, X., Zhao, H., Du, X., Wang, F., Jiang, Z., et al. (2008). Analysis of Host-Inducing Proteome Changes in *Bifidobacterium longum* NCC2705 Grown in Vivo. *J. Proteome Res.* **7**, 375–385.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., et al. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet* **364**, 937–952.
- Zanotti, I., Turroni, F., Piemontese, A., Mancabelli, L., Milani, C., Viappiani, A., Prevedini, G., Sanchez, B., Margolles, A., Elviri, L., et al. (2015). Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 6813–6829.
- Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J.L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., et al. (2011). Animal Models of Cardiovascular Diseases, Animal Models of Cardiovascular Diseases. *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* **2011**, **2011**, e497841.

Zeng, X.Q., Pan, D.D., and Guo, Y.X. (2009). The probiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. J. Appl. Microbiol. *108*, 2059-66.

Anexo

ARNasa A 10 mg/mL: se disuelven 20 mg de ARNasa A (Sigma-Aldrich) en 2 mL de acetato sódico 0,01 M pH 5,2. Se calienta a 100 °C durante 15 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente, se añade 0,1 volumen de de Tris-HCl 1M pH 7,4 y se conserva a -20 °C.

Azul de Coomasie: azul de Coomasie 0,1 % (p/v), metanol 40 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v).

Azul de metileno: azul de metileno 0,1 % (p/v), KOH 0,01 % (v/v).

PBS 1x: se pesan 8,2 g de NaCl, 0,27 g de KH_2PO_4 , 1,4 g de Na_2HPO_4 y 0,15 g KCl y se disuelven en 800 mL de agua. Posteriormente se ajusta el pH a 7,4, el volumen a 1 L y se esteriliza mediante autoclavado.

Reactivo OPA: se disuelven 66 mg de ditiotreitol en 10 mL de stock OPA y se mantiene en reposo al menos 30 minutos antes de su uso. Esta solución es estable durante 1 día.

SDS 10 %: se disuelven 100 g de SDS en 900 mL de agua. Se calienta a 68 °C hasta su completa disolución y se ajusta a pH 7,2 con HCl concentrado. Por último, se ajusta el volumen a un 1 L.

Solución de anticuerpo: dilución 1:5000 de anti-digoxigenina AP (Roche) en solución de bloqueo.

Solución de bloqueo: dilución 1/10 de la solución de bloqueo que viene con el kit *DNA Dig-High Prime* (Roche) en ácido maleico 0,1 M y NaCl 0,15 M pH 7,5.

Solución de desteñido (citotoxicidad celular por MTT): a 100 mL de 2-propanol se añaden 45 µL de HCl 36%R y 100 µL de Triton X-100.

Solución de desteñido (geles de proteínas): metanol 20 % (v/v), ácido acético 7 % (v/v).

Solución madre de MTT: se disuelven 5 mg/mL de MTT en PBS 1x. Se esteriliza mediante filtro de 0,2 μ m (Minisart, Sartorius) y se conserva a 4°C.

Solución taurocolato sódico 50 mM: se disuelven 0,269 g de taurocolato sódico en 10 mL de tampón TPNa. Para llevar a cabo las reacciones enzimáticas se emplea una dilución 1/10, usando solución taurocolato sódico 5 mM.

SSC 20x: se disuelven 175,3 g NaCl y 88,2 g citrato sódico en 800 mL de agua. Se ajusta a pH 7 y volumen 1 L.

Stock OPA: se disuelven 12 mg de OPA (Sigma-Aldrich) en 150 μ L de metanol, a continuación se añaden 10 mL de tampón borato y se mezcla. Por último, se añaden 60 μ L de lauril éter de polioxietileno y se mezcla. Esta solución es estable a temperatura ambiente durante al menos 3 semanas.

Tampón borato 1M pH 10,4 (ajustado con NaOH): se disuelven 30,91 g de borato sódico en 500 mL de agua y se ajusta el pH con NaOH.

Tampón de detección (hibridación de ácidos nucleicos): Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M pH 9,5.

Tampón de electrodos: se disuelven 3 g Tris base, 14 g glicina, 10 mL SDS 10 % (p/v) en agua destilada hasta 1 L, pH 8,1 – 8,5 (no es necesario ajustar pH).

Tampón de lavado (hibridación de ácidos nucleicos): ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,5, Tween 20 0,3 % (p/v).

Tampón de teñido (citometría para bacterias): borato sódico 100 mM, EDTA 60 mM, formaldehído 0,05 % (v/v), triton X100 0,05 % (p/v), pH 9,2.

Tampón SM: Gelatina 0,01 % (p/v), MgSO₄ 10 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

TE: pH 7,4: Tris-HCl 10 mM (pH 7,4); EDTA 1 mM (pH 8).

pH 7,6: Tris-HCl 10 mM (pH 7,6); EDTA 1 mM (pH 8).

pH 8,0: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM (pH 8).

TPK: KH_2PO_4 800 mM, K_2HPO_4 800 mM, pH ajustado por proporción de sales.

TPNa: Tampón fosfato sódico NaH_2PO_4 100 mM, Na_2HPO_4 100 mM pH 7 que contiene NaCl 100 mM. Se preparan las soluciones NaH_2PO_4 100 mM y Na_2HPO_4 100 mM en agua. Se mezclan hasta conseguir pH 7 y a esta última solución se añade NaCl 100 mM.

Tripsina-EDTA: solución de tripsina al 0,25 % (p/v) en EDTA (ácido etilen diamino tetra acético) 10 mM en PBS 1x, se esteriliza por filtración a 0,2 μm y se conserva a 4 $^{\circ}\text{C}$.