



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
CENTRO DE DETECCIÓN BIOMOLECULAR

Tesis:

“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE LACTOBACILOS Y SU PROBABLE
EFECTO ANTIATEROGÉNICO EN PERSONAS CON GENOTIPO APO E3 Y APO E4 “

Para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Microbiológicas

Presenta:

QFB JOSÉ ANTONIO VERGARA CRUZ

Asesora:

DC Lilia Cedillo Ramírez



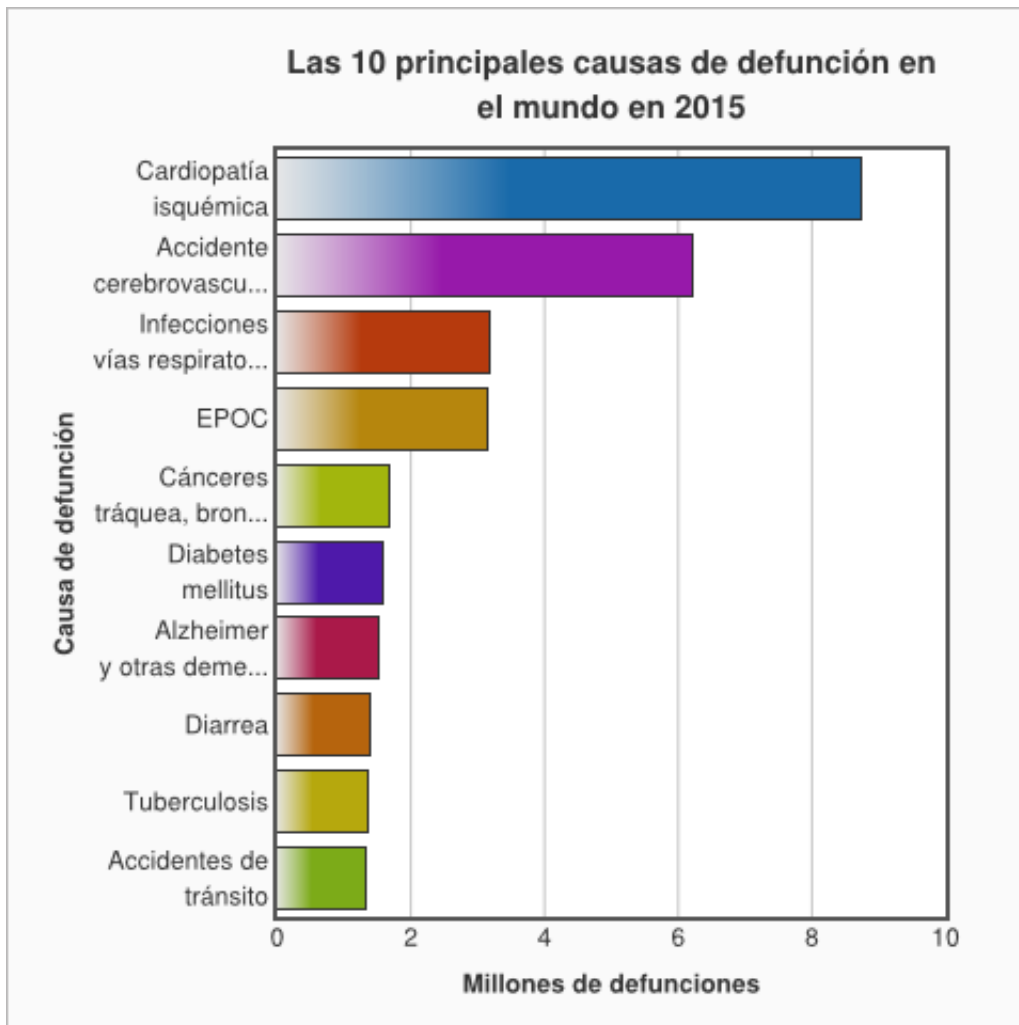
ENERO 2018

Introducción

Enfermedades cardiovasculares

Epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares son una de las primeras causas de muerte nivel mundial, tanto en países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo. Durante el año 2015 se reportaron 17.7 millones de muertes por esta causa, representando el 31 % de las defunciones mundiales. En la figura 1 se muestran las 10 principales causas de muerte durante el 2015, de acuerdo a reportes de la OMS, como se puede observar, en primer lugar se encuentra la cardiopatía isquémica, la cual deriva de complicaciones como la aterosclerosis. En países como Estados Unidos de acuerdo al Center for Disease Control and Prevention (CDC) constituyen 1 de cada 3 muertes, asimismo, diariamente 2,200 norteamericanos mueren, esto es, un promedio de una muerte cada 40 segundos¹. Por otro lado en México las estadísticas no difieren mucho, en el año 2015 se reportaron como la primera causa de muerte con un total de 128, 731 registros, mientras que a nivel estatal son la segunda causa.



Definición de enfermedades cardiovasculares.

Se definen como un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, que incluyen:

- Hipertensión arterial
- Cardiopatía coronaria (infarto al miocardio)
- Enfermedad cerebrovascular (apoplejía)
- Enfermedad vascular periférica
- Insuficiencia cardiaca
- Miocardiopatías
- Cardiopatía congénita

Existen diferentes factores de riesgo: los principales y los secundarios, los primeros son aquellos que se ha comprobado contribuyen al desarrollo de la patología, por otro lado, los secundarios elevan el riesgo de sufrir los trastornos cardiacos.

Factores principales:

- Hipertensión arterial: conocida como la muerte silenciosa, se produce cuando las arteriolas (arterias pequeñas) tienen un estrechamiento que ocasiona la necesidad del corazón de bombear la sangre con mayor fuerza y por consiguiente, un aumento en la presión de los vasos sanguíneos. Se considera como hipertensión arterial a la presión mayor o igual a 130/80 mmHg
- Diabetes: un paciente diabético tiene probabilidades de riesgo cardiaco debido a que una glucosa por encima del valor de referencia (mayor a 110 mg/dL) de forma constante, conlleva a una hipertrigliceridemia.
- Obesidad y sobrepeso: con el exceso de peso corporal se eleva el riesgo de hipercolesterolemia, hipertensión arterial y diabetes.
Para determinar si un paciente tiene sobrepeso u obesidad se realiza mediante el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) que establece la relación entre el peso en kilogramos de un individuo y su estatura. A través de la siguiente fórmula se realiza el cálculo de IMC:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (en Kilogramos)}}{\text{Estatura}^2 \text{ (en metros cuadrados)}}$$

Tabla 1.- Valores de IMC y su clasificación de acuerdo a la composición corporal

Composición corporal	IMC
Bajo peso	< 18.5
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	≥25.0 – 29.9
Obesidad	≥ 30.0 - >40
Obesidad tipo I	30.0 – 34.9
Obesidad tipo II	35.0 – 39.9
Obesidad tipo III	≥40.0

- Tabaquismo: en el corazón causa la aceleración de la frecuencia cardiaca, contracción de arterias principales y a su vez hipertensión arterial. El alquitrán y la nicotina afectan las concentraciones de colesterol y fibrinógeno (mayor riesgo de un coágulo en circulación periférica), asimismo provocan acumulación de colesterol LDL en las arterias (aterosclerosis). El tabaco contiene sustancias que propician la presencia de radicales libres y van a contribuir al estrés oxidativo así como la inflamación, este último proceso estimula la producción de proteínas de fase aguda y citocinas, que a su vez favorecen el aumento de proteína C reactiva, interleucina 6 y factor de necrosis tumoral, además de que se presenta una activación de linfocitos T y de monocitos a macrófagos².
- Sexo: durante la edad reproductiva, los hombres tienen mayor riesgo de un infarto que las mujeres, debido a que éstas tienen mayores requerimientos de colesterol que los hombres por la cantidad de hormonas que poseen derivadas del colesterol (progesterona, estrógenos y testosterona), además

los estrógenos tienen un efecto cardioprotector. Sin embargo, a partir de los 65 años el riesgo cardiovascular es el mismo tanto en varones como en mujeres.

- Actividad física: las personas de vida sedentaria tienen un mayor riesgo de un infarto que aquellas que realizan ejercicio de forma regular, ya que éstos últimos reducen los niveles de colesterol y glucosa, además de fortalecer el músculo cardíaco.
- Colesterol elevado: es el principal factor de riesgo cardiovascular, cuando el colesterol LDL (Low Density Lipoprotein) aumenta en sangre periférica, su exceso forma una placa en las arterias, llamada aterosclerosis y a largo plazo genera un infarto al miocardio.

Factores secundarios

- Alcohol: se ha demostrado que su consumo en pequeñas cantidades puede tener un efecto benéfico. Uno de los componentes de la uva es el resveratrol, que posee efectos antiinflamatorios y antioxidantes³ por lo que el consumo de una copa al día de vino puede tener efectos cardioprotectores. Por otro lado, el exceso de alcohol se ha relacionado con hipertensión, accidentes cerebrovasculares, arritmias y aumento de grasa corporal.
- Estrés: se ha asociado a un aumento de la frecuencia cardíaca, presión arterial y factores de coagulación, lo que incrementa el riesgo de que se forme un coágulo, obstruyendo una arteria, causando un infarto.

Endotelio vascular

Es el revestimiento interior de la arteria y se encuentra en contacto con la sangre periférica, las células endoteliales son las encargadas de formar el endotelio, además de ser estructurales también son funcionales, ya que secretan vasodilatadores, como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGI) y factor hiperpolarizante del endotelio (EDHF). También secreta vasoconstrictores como la endotelina y el factor vasoconstrictor derivado del endotelio (EDCF). El equilibrio de ambos es indispensable para mantener el endotelio en buen estado. Otras funciones incluyen actuar como barrera con permeabilidad selectiva; regular el tono y el crecimiento vascular, la respuesta inmune e inflamatoria, así como la actividad homeostática y trombótica.

El óxido nítrico es importante debido a que evita la agregación plaquetaria e inhibe a adhesión leucocitaria en el endotelio.

La permeabilidad endotelial se puede ver modificada por diversas causas, tales como algunas citocinas y endotoxinas. El mismo efecto es producido por la hipercolesterolemia, la resistencia a la insulina, la diabetes, la obesidad ya que son capaces de bloquear la síntesis de óxido nítrico, además de que el estrés oxidativo ocasiona la presencia de radicales superóxido, los cuales reducen los niveles de óxido nítrico e incrementan la adhesión de macrófagos en el endotelio vascular.

Además, el Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B)⁴ favorece la presencia de citocinas proinflamatorias (IL-1 y 6), factor de Necrosis Tumoral (TNF), moléculas de adhesión (selectina –E) y factor quimiotáctico de los monocitos. Dos factores adicionales contribuyen a potenciar el proceso inflamatorio, la oxidación de colesterol LDL y la secreción de metaloproteasas por parte de las células espumosas, que degrada al colágeno y la elastina. Todo esto contribuye a la formación de la placa ateromática de forma importante.

Una función importante del endotelio vascular consiste en proveer una superficie no trombogénica, valiéndose de la capacidad de las células endoteliales para segregar óxido nítrico y prostaciclina, dos potentes inhibidores de la activación y agregación plaquetaria⁵.

Otra función importante es la regulación de la permeabilidad vascular porque las lipoproteínas en condiciones normales son incapaces de cruzar las uniones intercelulares, sin embargo durante las aterosclerosis son de las primeras moléculas en migrar al torrente sanguíneo.

La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de lípidos, proteínas y componentes celulares en la pared arterial.

Aunque la acumulación de lípidos en el torrente sanguíneo va a permitir el progreso de la aterosclerosis es la causa subyacente, siendo la principal el desgaste del endotelio vascular, que ocasiona inflamación celular y a su vez, la permeabilidad se ve modificada, lo que facilita el ingreso de macromoléculas como lipoproteínas⁵.

Proceso de la aterosclerosis

El exceso de colesterol LDL se acumula en el sub-endotelio vascular, lo que permite la presencia de Moléculas de Adhesión Leucocitaria al Endotelio (ELAMs) y el factor estimulante de colonias de los monocitos que a su vez ocasiona un aumento de monocitos en el endotelio, siendo guiados hacia el subendotelio por una proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1). Esta proteína es estimulada por la presencia de colesterol LDL oxidado.

La formación de células espumosas se presenta debido a que los monocitos una vez transformados en macrófagos fagocitan los ésteres de colesterol, ya que han sido reconocidos como un cuerpo extraño. Esta combinación forma el núcleo lipídico de la placa ateromatosa.

Los radicales superóxido formados por la disfunción endotelial oxidan fácilmente al colesterol LDL, después, se produce una intensa inflamación que favorece la presencia de células del músculo liso y linfocitos T, dando pie a la formación de una membrana fibrosa que aísla el proceso inflamatorio del resto de la arteria, sin embargo, el ateroma sigue aumentando de tamaño porque continúan ingresando moléculas de colesterol LDL y macrófagos. Posteriormente la placa ateromatosa

intenta ser eliminada del endotelio mediante una adhesión plaquetaria, que lejos de favorecer la eliminación contribuye al crecimiento del ateroma.

Una vez que se ha formado el ateroma puede ser una placa estable o una placa vulnerable. La primera posee un núcleo lipídico pequeño y una membrana fibrosa gruesa, no causa síndromes isquémicos agudos pero reduce considerablemente la luz arterial, se asocia a angina de pecho estable o angina mesentérica. La placa vulnerable se caracteriza por un núcleo lipídico grande y una membrana fibrosa delgada por lo que es sensible a romperse y producir trombosis arterial oclusiva además de que hay una inflamación intensa y se asocia a infarto al miocardio.

Como el colesterol es transportado en lipoproteínas, específicamente de baja densidad (LDL), los niveles de colesterol son directamente proporcionales a los niveles de lipoproteínas LDL. Se considera un alto riesgo aterogénico cuando un paciente presenta cantidades de colesterol igual o mayor a 240 mg/dl.

Pacientes con alta posibilidad de aterosclerosis son aquellos con hipercolesterolemia familiar, la cual consiste en una mutación en uno o ambos genes que codifican para el receptor de LDL. En la forma heterocigota el colesterol suele elevarse al doble de lo normal, en cuanto a los homocigotos pueden ser hasta 4 veces los niveles normales.

Metabolismo de las lipoproteínas

Lipoproteínas

Son moléculas constituidas por lípidos y proteínas, que tienen como función transportar lípidos de un medio acuoso como la sangre hasta los músculos o el tejido adiposo. Las apolipoproteínas son la parte proteica de las lipoproteínas, tienen diversas funciones, contribuyen a la solubilidad de las lipoproteínas, actúan como ligandos para receptores celulares y como cofactores de enzimas relacionadas con el metabolismo de las lipoproteínas. Se nombran en función de una letra y un número que van de Apo A1 hasta Apo M.

Quilomicrones

Una vez que las grasas entraron en el intestino delgado y fueron metabolizadas y absorbidas por los ácidos biliares, se sintetizan los quilomicrones en la pared intestinal responsables de transportar grasas a los tejidos que las necesitan. Los quilomicrones son moléculas de gran tamaño que varía de acuerdo a la cantidad de triglicéridos y ácidos grasos que contienen, así también están constituidas por Apolipoproteínas de tipo B (B48) y del tipo A (A-I,A-II y A-IV) y del tipo E. los quilomicrones pasan por el espacio intersticial hacia los capilares linfáticos mesentéricos y de ahí al torrente sanguíneo, para posteriormente llegar a tejido blanco, ya sea músculo o tejido adiposo, es decir, su uso o almacenamiento

respectivamente. En ambos destinos adquiere la Apolipoproteína C-II, que es cofactor para la acción de una enzima llamada lipoproteinlipasa (LPL). Los productos de este catabolismo son ácidos grasos que van a ser una fuente energética. Los remanentes son llamados quilomicrones residuales que están formados por apolipoproteínas B48 y E, a continuación son captados por los hepatocitos, que se encargan de reciclar algunos componentes como fosfolípidos, colesterol no esterificado y algunas apolipoproteínas para sintetizar lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Lipoproteínas de muy baja densidad

Son producto de la lipólisis de tejido adiposo y se sintetizan a partir de ácidos grasos y glicerol, son muy parecidas a los quilomicrones pero con algunas diferencias, no poseen Apo A-I pero sí tienen Apo-B 100, el estímulo para la síntesis de VLDL es la captación y catabolismo de quilomicrones residuales en el hígado.

Tienen muchas similitudes con los quilomicrones, también tienen por función el suministro de triglicéridos y ácidos grasos en tejido muscular y adiposo, requiere de la enzima LPL y su cofactor Apo C-II, su catabolismo también es una vía de síntesis de HDL. Sin embargo, son de menor densidad que los quilomicrones.

Lipoproteínas de densidad intermedia

Proviene casi exclusivamente del metabolismo de las VLDL, se encuentran enriquecidas con ésteres de colesterol y poseen menor cantidad de triglicéridos en comparación con las VLDL, además se encuentra ausente Apo C-II, pero abunda Apo E. Pueden tener una de 2 vías

1.-El 60% son captadas por los receptores para LDL del hepatocito, ya que los receptores tienen mayor afinidad por Apo E que por Apo B100, al ser reconocidas son ingresadas al interior de la célula y degradadas.

2.- El 40% restante son catabolizadas por una lipasa hepática, cuya acción tiene como fin la producción de LDL, por lo que se cree que un alto nivel de VLDL es un factor de riesgo para hipercolesterolemia y aterosclerosis.

Cabe mencionar que la acumulación de IDL está relacionada a una enfermedad llamada disbetalipoproteinemia familiar, que se debe a la presencia de una variante de Apo E (genotipo Apo E2/E2), ocasionando una menor afinidad por los receptores hepáticos de Apo E.

Lipoproteínas de baja densidad

Es la lipoproteína más abundante en el ser humano y se considera el resultado del catabolismo de VLDL e IDL, su componente mayoritario son los ésteres de colesterol, lo que las hace la principal molécula que transporta el colesterol, al estar conformadas solamente por Apo B100, éste va a ser reconocido por receptores situados en la membrana plasmática quienes también reconocen Apo E. es importante resaltar que estos receptores son sintetizados en diferentes estirpes celulares, lo que permite a las LDL ser reconocidas en diferentes tejidos.

El receptor LDL en la membrana plasmática se encuentra unido a una proteína (clatrina), ésta última va a permitir que haya endocitosis, este proceso se repite cada 5 minutos, haya o no unión de LDL con su receptor, si hay dicho enlace las lipoproteínas son degradadas a aminoácidos y colesterol no esterificado, sin embargo, éste último en grandes cantidades puede ser tóxico para la célula por lo que lo utiliza para síntesis de hormonas esteroideas o membranas celulares, o bien como de reserva, requiriendo de una enzima llamada acil colesterol aciltransferasa (ACAT) que convierte el colesterol no esterificado en esterificado.

Una vez que el receptor LDL ha cumplido su función puede ser reciclado o degradado, este segundo proceso se lleva a cabo mediante la Pro-proteína Convertasa Subtilisina/ Kexina tipo 9 (PCSK 9), que recientemente ha sido utilizado como probable tratamiento contra la aterosclerosis (anticuerpos monoclonales anti-PCSK9)⁶

La regulación del colesterol y de las LDL va a depender de sus funciones, si hay una disminución de LDL, se activa una enzima llamada Hidroximetilglutaril CoA (HMG CoA) reductasa que activa la síntesis hepática de colesterol (Vía endógena), por el contrario, un aumento en la concentración de LDL eleva la captación a nivel hepático de colesterol y simultáneamente inhibe a la HMG CoA reductasa, resultando en una disminución de los receptores LDL.

Lipoproteínas de alta densidad

Están conformadas por Apo AI y ésteres de colesterol, su síntesis va a depender del catabolismo de partículas ricas en triglicéridos (Quilomicrones y VLDL).

Sus funciones son las siguientes:

- Efecto antiinflamatorio y antitrombótico
- Inhibición de la modificación oxidativa de LDL
- Transporte reverso de colesterol

Esta última es la función más importante, ya que consiste en el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para poderlo eliminar. La eficacia de este proceso va a estar en relación al contenido de Apo A-I, puesto que es la proteína que va a facilitar la salida de colesterol y fosfolípidos (eflujo), utilizando transportadores tipo ABC A1 y G1, así como receptores tipo Scavenger B1 (SR B1). Debido a que el colesterol en las HDL se encuentra no esterificado, es necesario esterificarse para lo que requiere de la enzima Lecitin Colesterol Acil Transferasa (LCAT), quien va a valerse de Apo AI como cofactor. Una vez llevado a cabo el proceso de esterificación las HDL han aumentado de tamaño y al interaccionar con el receptor Scavenger (SR-B1) del hepatocito van a liberar su contenido, que tendrá uno de dos fines, ya sea eliminación hepática (en forma de bilis) o intestinal (a través de las heces), o bien se convertirán en ácidos biliares que serán eliminados después de haber sido utilizados o reabsorbidos a nivel intestinal⁷.

Las HDL tienen un papel fundamental en la protección contra aterosclerosis, ya que se ha descrito como el producto del desequilibrio entre la salida y la entrada de

colesterol en la arteria, siendo las HDL responsables de la primera y las LDL del segundo proceso.

Funciones antiateroscleróticas de HDL⁸

- Actividad antioxidante
- Inactivación del complemento
- Fibrinólisis
- Anti trombosis
- Anti apoptosis
- Eflujo de colesterol
- Regulación de la inflamación
- Protección del endotelio
- Regula actividad secretora del endotelio

Apolipoproteínas

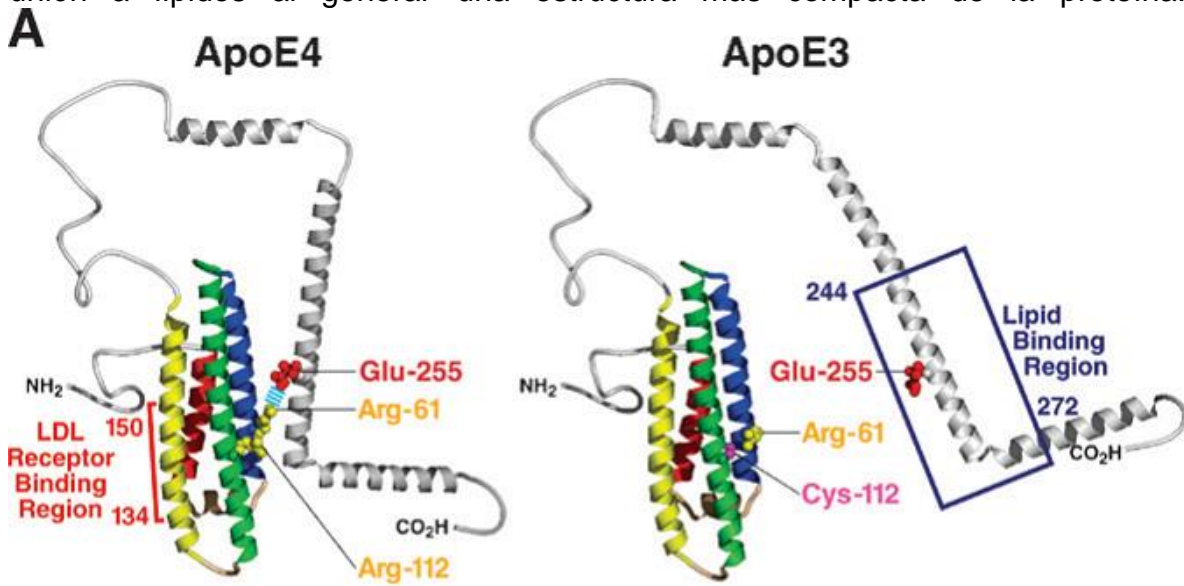
Para que los lípidos puedan ser transportados en el plasma necesitan formar complejos con proteínas, a dicha asociación se le conoce como lipoproteínas, están formados por un centro hidrofóbico de ésteres de colesterol y una capa externa de colesterol, fosfolípidos y apolipoproteínas

Estructura de Apo E

Es una proteína de 34 KDa formada por 299 aminoácidos, presenta 3 isoformas (ApoE2, ApoE3, ApoE4) y son codificados por el gen Apo E, localizado en el cromosoma 19. La frecuencia de los alelos es muy marcada E4 (15-20 %), E3 (65-70%), E2 (5-10%), asimismo, las combinaciones de éstos 3 alelos permiten ya sea uno de los tres fenotipos homocigotos (E2/E2, E3/E3 o E4/E4) o tres heterocigotos (E2/E3, E3/E4 o E2/E4).

Las isoformas de Apo E difieren en dos sitios: ApoE3 tiene un residuo aminoacídico de cisteína en la posición 112, mientras que en la posición 158 tiene una Arginina, ApoE4 tiene arginina en ambos sitios y ApoE2, cisteínas en las mismas posiciones. En la apoE3, que es la forma más frecuente, la Arg158 forma un puente salino con el Asp154. En la apoE2 la falta de Arg158 impide la formación de ese puente salino (aunque se forma otro entre Arg150 y Asp154) y esto afecta a la región de unión con el receptor. En la apoE4, la presencia de la Arg112 hace que la cadena lateral de la Arg61 del dominio N-terminal se salga de la hélice y pueda interactuar electrostáticamente con el Glu255 del extremo C-terminal; esto afecta a la región de

unión a lípidos al generar una estructura más compacta de la proteína.



Apo E tiene dos dominios estructurales separados por una región bisagra. El dominio amino terminal contiene la región de unión al receptor, formando un bucle de 4 hélices antiparalelas. Por otro lado el carboxilo terminal contiene la región de unión a lípidos.

La Apolipoproteína E se sintetiza principalmente en el hígado (> 75%), en segundo lugar es el cerebro, también se produce en células como los astrocitos, neuronas y macrófagos.

La función de Apo E es el transporte de lipoproteínas ricas en colesterol y triglicéridos (Quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y algunos subtipos de HDL). Apo E también se ha asociado a enfermedad de Alzheimer, ya que en el cerebro el transporte de lípidos es indispensable para el mantenimiento y reparación neuronal, en pacientes con esta enfermedad (60-80%) se ha encontrado al menos un alelo Apo E.

En ApoE4 Arg112 forma un puente salino con Glu 109, lo que causa que Arg 61 se extienda fuera de la hélice e interactúe con Glu 255 dentro de la región de unión a lípidos, generando una estructura más compacta. Sin embargo, una mutación en Arg 61 por treonina o Glu 255 por alanina, impiden la interacción y ocasiona que ApoE4 mutado tenga una función similar a ApoE3.

La interacción de Arg 61 con Glu 255 es el responsable de la preferencia de ApoE4 por VLDL y sus remanentes, además acelera su eliminación, lo que conlleva a la disminución de receptores LDL y por tanto aumento en los niveles de LDL.

Los niveles plasmáticos de Apo E son determinantes en el metabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos y explican una variabilidad de 20-40% de los niveles de triglicéridos en humanos, ya que poca cantidad de Apo E disminuye el metabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos y un exceso de Apo E va a estimular la producción hepática de VLDL y disminuye la lipólisis, lo que genera

hipertrigliceridemia, por tanto es importante una expresión óptima de Apo E para un metabolismo normal de lipoproteínas ricas en triglicéridos⁹.

Estas diferencias estructurales han favorecido que ApoE2 sea asociado a hiperlipoproteinemia tipo III y ApoE4 a enfermedades cardiovasculares y Alzheimer, además también se ha considerado como factor de riesgo para diabetes mellitus tipo 2.¹⁰

Microbiota intestinal

La microbiota se define como la comunidad particular de microorganismos que residen en un área del cuerpo humano, incluyendo bacterias, arqueas y virus. Está constituida por bacterias, arqueas, virus y bacteriófagos, incluso eucariotes unicelulares, tales como hongos.

La microbiota está constituida en su mayoría por firmicutes y bacteroides, en menor proporción actinobacterias, cianobacterias, fusobacterias, proteobacterias y verrumicrobia.

La dieta (microorganismos ingeridos en los alimentos) y fisiología del hospedero modifican el ambiente intestinal, además hay competición por los nutrientes y a su vez alteran la composición de la microbiota. Otros factores que alteran la composición de la microbiota son la genética del hospedero, estilo de vida, fármacos que consume.

En humanos estos cambios en la microbiota se han asociado a diferentes enfermedades como la diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis. En ésta última se ha sugerido que está asociada a bacterias, ya que en algunas placas ateroscleróticas se encontró ADN bacteriano.^{11, 12}

No solamente se ha descrito como un factor de riesgo para el inicio de la enfermedad, sino también contribuye de forma importante en el desarrollo.¹³

Se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales la microbiota puede contribuir a las enfermedades cardiovasculares, tales como: la invasión directa del hospedero, activación del sistema inmune innato por productos bacterianos como lipopolisacáridos, alteraciones en el metabolismo, metabolitos producidos por la microbiota también juegan un papel durante el desarrollo de la aterosclerosis, ya que algunos son especies proaterogénicas como el TMAO¹⁷ (trimetilamina N-Oxido), que deriva de la digestión de carnitina y colina presente en los alimentos.¹⁴

También la microbiota tiene un impacto fuerte en la fisiología, metabolismo y en nuestro sistema inmune, el cual juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Asimismo, la cavidad oral y el intestino se han descrito como fuentes de bacterias asociadas a placas ateromatosas.¹⁵

Las infecciones intervienen en el progreso de la aterosclerosis en dos formas:

1. Las infección directa en el vaso sanguíneo, que causa un sitio propenso convertirse en lesión aterosclerótica.

2. Las infecciones indirectas en un sitio diferente de la placa aterosclerótica, ocasionan la activación del sistema inmune, para de esta forma incrementar el estado inflamatorio sistémico.

Una mayor permeabilidad en el intestino conlleva a un aumento sistémico en los niveles de productos bacterianos, causando inflamación crónica en bajo grado y contribución a la aterogénesis, también se ha asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina y subsecuentemente efectos en los lípidos¹⁶.

Mecanismos de los lactobacilos para reducir el colesterol

Uno de los mecanismos, muy general de los lactobacilos para disminuir el colesterol consiste en reducir la asimilación de colesterol intestinal para disminuir la absorción de colesterol¹⁷.

Otro mecanismo es mediante una enzima que poseen algunas especies de lactobacilos, llamada hidrolasa de las sales biliares. Esta enzima cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con taurina o glicina en residuos aminoacídicos y sales biliares libres, éstas últimas son menos insolubles que las conjugadas por lo que su absorción es deficiente, siendo necesaria la síntesis de nuevas sales biliares para reemplazar las perdidas en la circulación enterohepática.¹⁸

De forma particular hay especies de lactobacilos que tiene mecanismos concretos para reducir el colesterol. *Lactobacillus plantarum* tiene actividad antiinflamatoria, lo que disminuye la presencia de proteínas de fase aguda².

El Ibuprofeno (un antiinflamatorio) es un derivado del ácido propiónico, siendo éste último producido en gran cantidad por *L. plantarum* a partir de la fibra contenida en los alimentos, de ahí se ha sugerido el efecto antiinflamatorio de esta especie de lactobacilos².

Este microorganismo ha demostrado tener importantes efectos en los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, tales como la disminución de la presión sanguínea sistólica (antihipertensivo), fibrinógeno (anticoagulante), leptina (inhibición del apetito)².

Lactobacillus reuteri tiene efectos inhibidores de la obesidad tales como reducir la inflamación (un proceso previo en el desarrollo de la obesidad), aumenta la actividad hepática del metabolismo de lípidos¹⁹, además tiene como 2 metabolitos de particular interés²⁰, una proteína llamada reuterina que es capaz de transformar el ácido linoleico a uno de sus isómeros (ácido linoleico conjugado), el cual tiene como características el aumento de la lipólisis, reducción del estrés oxidativo. El otro metabolito es la cobalamina que disminuye los niveles de homocisteína, un compuesto que se ha propuesto estar asociado a mayor riesgo cardiovascular.²¹

L. acidophilus tiene la capacidad de convertir el colesterol en coprostanol, un compuesto muy común en las heces fecales, es decir, se disminuye la absorción de colesterol y se elimina en la materia fecal²².

Algunos lactobacilos (*L. acidophilus*) son capaces de incorporar el colesterol a su envoltura y ser más resistentes a la muerte por sonicación y lisis celular²².

Justificación

Las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis son las primeras causas de muerte entre la población a nivel mundial y en México y suelen permanecer asintomáticas hasta muy avanzada la patología.

La determinación y cuantificación del genotipo Apo E es una herramienta de gran utilidad para evaluar el riesgo de aterosclerosis en un paciente, así como los niveles de colesterol total y sus respectivas fracciones: LDL, HDL y VLDL.

Por otra parte, debido a que los lactobacilos tienen un efecto hipocolesterolemizante es de gran relevancia caracterizarlos y estudiar el posible papel cardio protector que pudieran jugar en personas con el genotipo Apo E 3,4.

Objetivo general

Comparar las poblaciones de lactobacilos, perfil de lípidos y cuantificación de Apolipoproteína E, en dos grupos de personas con genotipo ApoE3/E4 para inferir el probable efecto antiaterogénico.

Objetivos particulares

- 1.-Estandarizar la técnica de PCR para lactobacilos.
- 2.- Cuantificar ApoE3 y ApoE4 por ELISA, así como los niveles de colesterol total, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos.
- 3.-Aislar e identificar las diferentes especies de lactobacilos tanto en personas sin riesgo aterogénico como en personas con riesgo aterogénico.
- 4.-Establecer la relación entre la presencia de determinadas especies de lactobacilos con un probable efecto antiaterogénico.

Criterios de inclusión

Pacientes preferentemente con antecedentes de altos niveles de colesterol y triglicéridos (> 200mg/dL y > 160 mg/dL) , mayores de 18 años o con familiares

directos con genotipo Apo E3/E4, ya sea con o sin actividad física así como al menos, un antecedente de riesgo cardiovascular.

Criterios de exclusión

Pacientes menores de 18 años, sin antecedentes cardiovasculares o patología diferente a problemas cardiacos.

Criterios de eliminación

Pacientes que a pesar de tener el genotipo ApoE3/E4 no proporcionaron la muestra de excremento

Universo

Se muestrearon un total de 68 pacientes que cumplieran con al menos uno de los criterios de inclusión.

De los cuales se obtuvieron 27 pacientes con genotipo Apo E3/E4, 38 con E3/E3, 2 con E2/E3 y 1 con E4/E4.

A los 27 pacientes con genotipo Apo E3/E4 se les realizó también perfil de lípidos y cuantificación de ApoE3 y ApoE4. Esta población está conformada por 15 hombres y 12 mujeres, con un rango de edad de 21 a 68 años.

Metodología

Se les tomó a los 65 candidatos a participar en el estudio, una muestra de sangre para definir si podían ser incluidos en el estudio, inicialmente, se hizo la extracción de ADN, posteriormente por PCR en tiempo real se determinó si poseían el genotipo E3/E4 y de ser así se les solicitó una muestra de materia fecal para la identificación de ciertas especies de lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. salivarius*), además con la misma muestra de sangre se les realizó perfil de lípidos (colesterol total, HDL, LDL, VLDL y Triglicéridos) y por técnica ELISA, la cuantificación de ApoE3 y ApoE4.

El medio utilizado para el crecimiento de lactobacilos fue agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe), que favorece el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, sin embargo fue

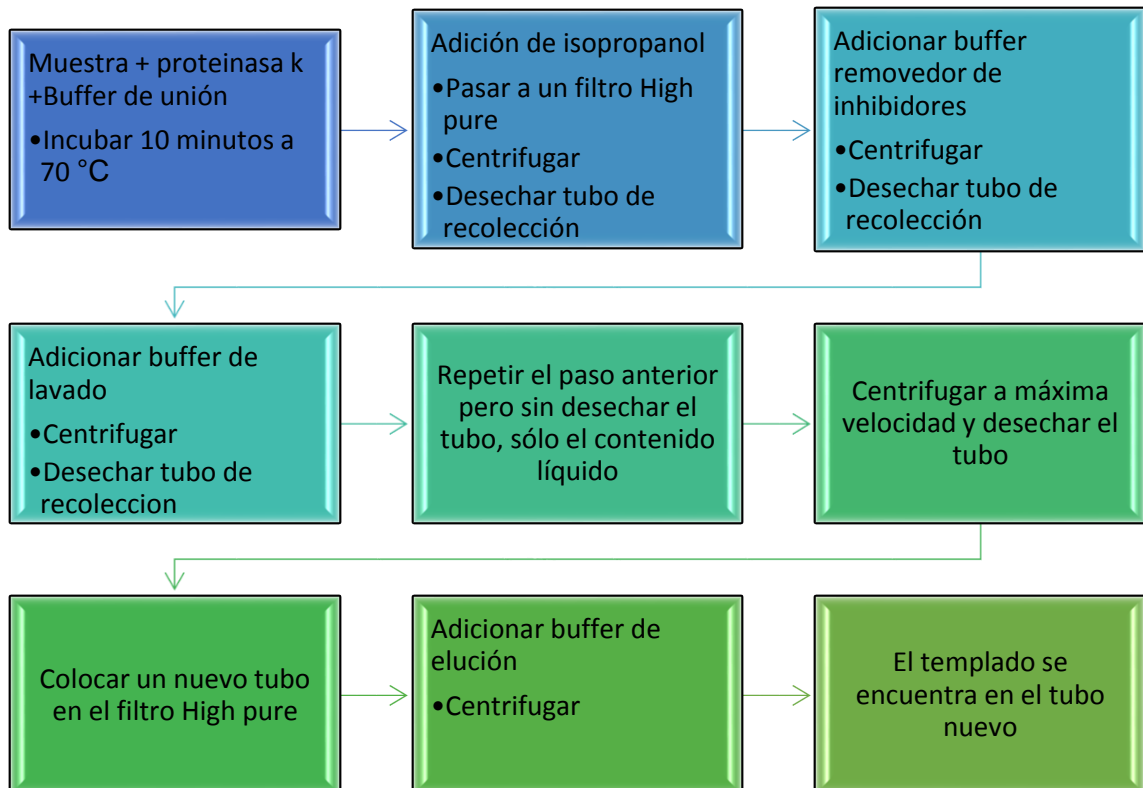
modificado agregándole sales biliares al 0.15 % para hacerlo selectivo hacia lactobacilos.

Para verificar que las especies identificadas fueran las correctas se mandaron a secuenciar 3 diferentes especies (*Lactobacillus salivarius*, *L. brevis* y *L. casei*).

Determinación del genotipo Apo E3/E4

Extracción de ADN

Las células fueron lisadas usando una breve incubación con proteinasa K en presencia de sal caotrópica (guanidina-HCl). Los ácidos nucleicos celulares se unen selectivamente a fibras de vidrio pre-empacadas en un filtro. Un buffer removedor de inhibidores contiene heparina (100 u/mL), que permite deshacerse de contaminantes inhibidores de la PCR. Los ácidos nucleicos son purificados mediante lavados para eliminar restos celulares, sales y proteínas. La elución se lleva a cabo con bajas concentraciones de sales, para liberar los ácidos nucleicos retenidos en la fibra de vidrio.



PCR en tiempo real

Al igual que la PCR punto final el proceso es similar, con algunas diferencias importantes, requiere de una sonda que va a estar marcada con un fluoróforo, el cual se va a excitar y a emitir fluorescencia, y es captado por el termociclador.

Para realizar la PCR en tiempo real, se llevó a cabo mediante la técnica de capilar.

El termociclador posee una cámara en la que se calienta el aire que tiene por medio de una bobina de calentamiento. Los tubos capilares tienen una elevada relación volumen/superficie, haciéndolos sensibles a cambios de temperatura, permitiendo que los ciclos durante la PCR sean rápidos. Además el capilar está fabricado con borosilicato, material que tiene una óptima transmisión de fluorescencia.

Reactivo	Volumen (µl)
Agua grado PCR	9.8
Sondas y primers	2.0
DMSO	1.2
Master plus (incluye 25 mM MgCl ₂)	2.0
Templado	5

Aislamiento de las especies de lactobacilos

Agar MRS modificado

Fundamento:

Los lactobacilos son microorganismos capaces de colonizar el intestino, por lo que al ingerirlos en los alimentos tienen la habilidad de resistir las condiciones adversas para cualquier microorganismo en el tracto digestivo, tales como el pH gástrico y la presencia de bilis en el intestino.

La adición de bilis en pequeñas cantidades al agar MRS representa la opción más viable porque no interfiere con la gelificación del medio y no se inhibe el crecimiento de lactobacilos.

La importancia de modificar el medio radica en que se demostró que enterobacterias comunes en heces son capaces de crecer en el medio a pesar de ser considerado selectivo para lactobacilos.

Proceso:



Controles positivos:

Las cepas utilizadas como controles positivos fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología oral de la facultad de Estomatología de la BUAP y otras obtenidas de productos comerciales con alguna cepa de interés para este estudio.

Identificación de lactobacilos mediante PCR punto final

PCR punto final

La ADN polimerasa es una enzima que de forma natural tiene la capacidad de sintetizar ADN de las células. Basados en este principio se obtienen múltiples copias de un fragmento de ADN de tamaño conocido, que se pone en evidencia mediante una electroforesis y revelado en presencia de luz ultravioleta. Los reactivos necesarios son el templado (molde), la enzima taq polimerasa, oligonucleótidos o primers, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), ión Magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora (buffer) y agua grado PCR. Además es necesario un termociclador que es un equipo que tiene la facultad de hacer cambios rápidos de temperatura. Para la identificación de lactobacilos se utilizó el gen 16s ribosomal o en algunos casos la región intergénica 16s-23s ribosomal.

Preparación de la reacción para PCR

Cada reacción de PCR fue llevada a cabo con un volumen final de 25 µl, con las siguientes cantidades de cada reactivo:

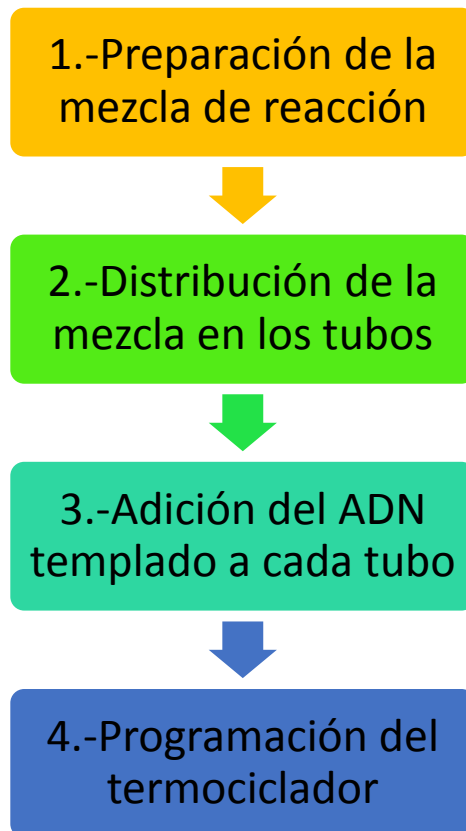
Reactivo	Volumen (μl)
Agua grado PCR	17.3
Buffer Dream Taq 10x (KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ y 20 mM MgCl ₂)	2.5
dNTPs 1mM	1
Enzima Dream taq 10x	0.125
Oligonucleótido forward (10 μM)	1
Oligonucleótido reverse (10 μM)	1
Templado	2

Oligonucleótidos

Los primers utilizados fueron los siguientes:

Primer	Secuencia
LU-1F	ATTGTAGAGCGACCGAGAAG
LU-3F	AAACCGAGAACACCGCGTT
LU-5F	CTAGCGGGTGCGACTTTGTT
Ldel-7F	ACAGATGGATGGAGAGCAGA
Lac-2R	CCTCTTCGCTCGCCGCTACT
Laci-1F	TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC
Laci-1R	CCTTCCCTCACGGTACTG
Lsal-1F	AATCGCTAAACTCATAACCT
Lsal-1R	CACTCTCTTTGGCTAATCTT
Lreu-4F	CAGACAATCTTTGATTGTTTAG
Lreu-4R	GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC
Lpla-3F	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT
Lpla-3R	CCTGAACTGAGAGAATTTGA
Lfer-3F	ACTAACTTGACTGATCTACGA
Lfer-3R	TTCAGTCTCAAGTAATCATC

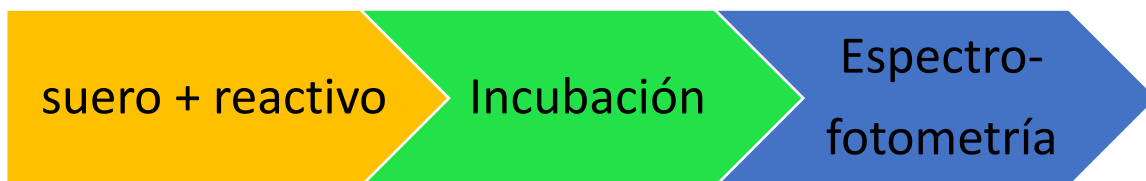
Diagrama general de las reacciones de PCR (Punto final)



Perfil de lípidos

Se basa en un proceso de espectrofotometría, es decir, un haz de luz es incidido a través de la muestra a medir, una menor cantidad de luz que pasa del otro lado de la celda que contiene la muestra indica una mayor concentración de ésta.

La muestra es mezclada con un reactivo e incubada durante un breve lapso de tiempo a 37 °C. La presencia e intensidad de color es directamente proporcional a la concentración del analito medido.



Valores de referencia del perfil de lípidos para la población mexicana

Parámetro	Valores de referencia
Colesterol total	< 200 mg/dL
HDL	30-85 mg/dL
VLDL	0-40 mg/dL
LDL	< 150 mg/dL
Triglicéridos	40-165 mg/dL

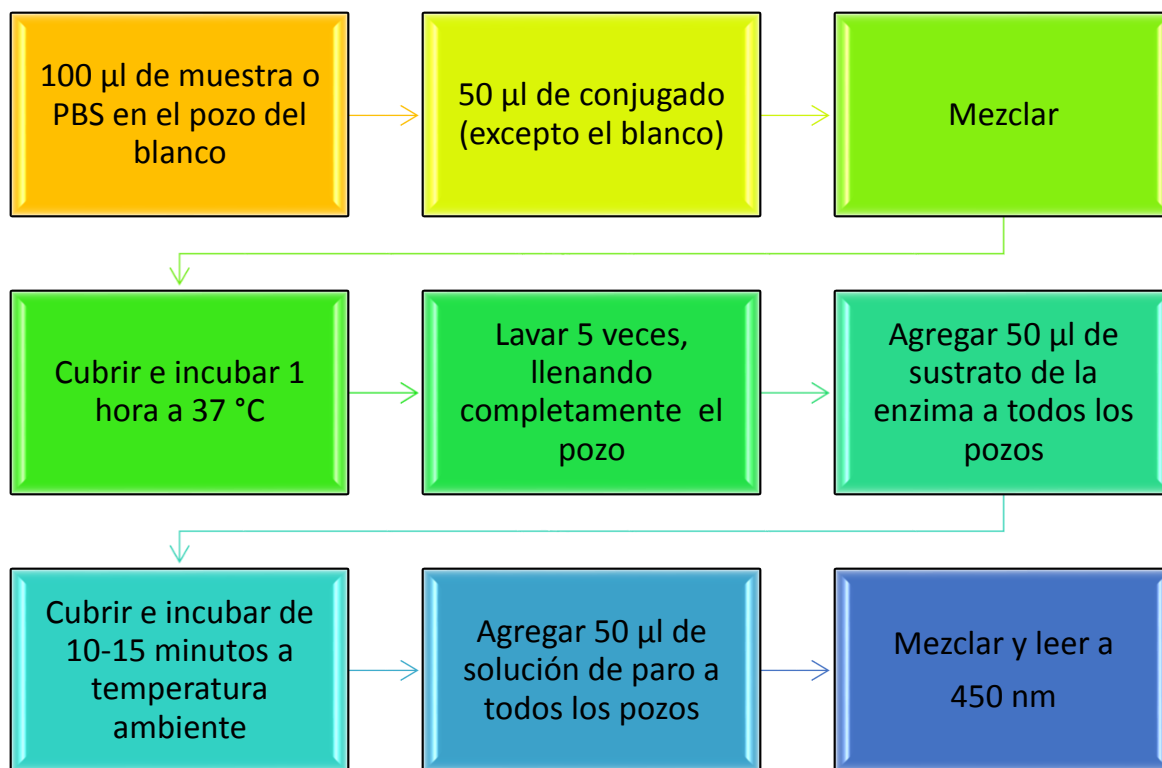
Protocolo ApoE

Fundamento:

Se basa en un ELISA competitivo.

Cada pozo de la microplaca fue recubierto con anticuerpos monoclonales, ya sea anti-Apo E3 o anti-ApoE4. Las muestras se incubaron junto con un conjugado ApoE-HRP (En inglés, Peroxidasa de rábano) en la placa, lo que permitió una competición entre el conjugado y las muestras, debido a que cada pozo tiene un número limitado de sitios de unión en los anticuerpos, posteriormente se agrega el sustrato de la enzima, que al unirse al conjugado formará un color que es inversamente proporcional a la concentración de ApoE. Finalmente la placa fue medida por espectrofotometría a 450 nm y se extrapolan en una curva de calibración previamente diseñada.

Proceso:



Secuenciación

Para realizar la secuenciación se seleccionó al azar reacción positiva a una de las tres especies y se procesaron 2 reacciones de PCR punto final por cada una en volúmenes de 25 µl, es decir, 50 µl de reacción, se verificó la presencia del producto esperado a través de electroforesis. Posteriormente se hizo una limpieza del producto de PCR utilizando un kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit®). Después de la limpieza del producto de PCR nuevamente se hizo una electroforesis para corroborar la presencia de la banda de interés y la ausencia de productos no deseados.

Finalmente la secuenciación se efectuó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y una vez obtenidas las secuencias se generó el alineamiento con un software (Geneious®)

Análisis estadístico

Con intervalo de confianza de 95 %, se utilizaron 3 pruebas estadísticas no paramétricas, según fuera necesario el caso:

- 1.-Kruskal-Wallis
- 2.-U de Mann-Whitney
- 3.-Chi cuadrada

Resultados:

Aislamiento e identificación de lactobacilos

Aislamiento de lactobacilos

El medio MRS se modificó a través de la adición de bilis al 0.15%, para garantizar un aislamiento de lactobacilos a partir de la materia fecal, ya que muchos microorganismos podían crecer en el medio. Algunos microorganismos comunes de la microbiota intestinal como *Enterococcus faecalis* y *E. coli* fueron utilizados como control para asegurar la inhibición de éstos con la modificación del medio.

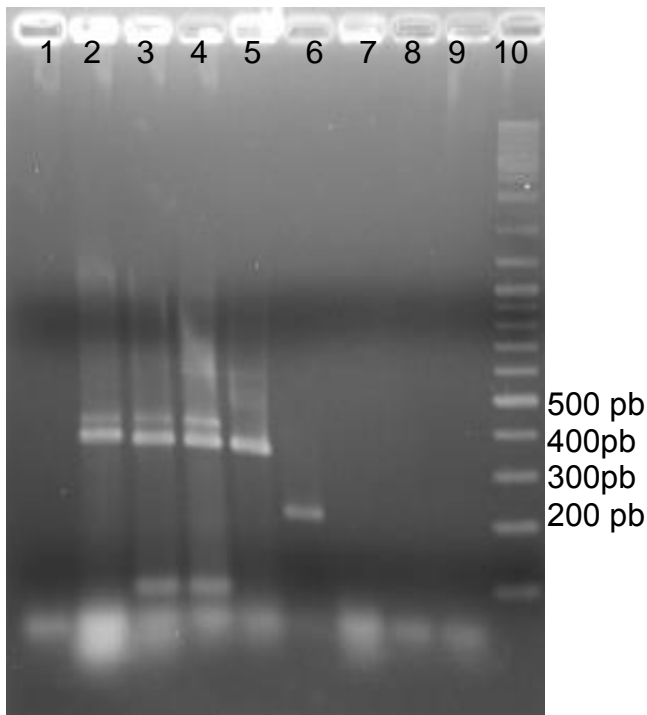


Figura 1.- Lactobacilos en agar MRS con 0.15% de bilis

Identificación de especies de lactobacilos

PCR dúplex

Para simplificar la identificación de las especies de lactobacilos se replicó una metodología reportada,²³ donde se diseñaron 2 pares de primers y al amplificar un fragmento (350 pb) sugería unas especies (*L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*), mientras que al amplificar un fragmento de otro tamaño (400 pb), alude a otras especies (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*), sólo 2 especies (*L. acidophilus* y *L. brevis*) no fueron incluidas en esta metodología.

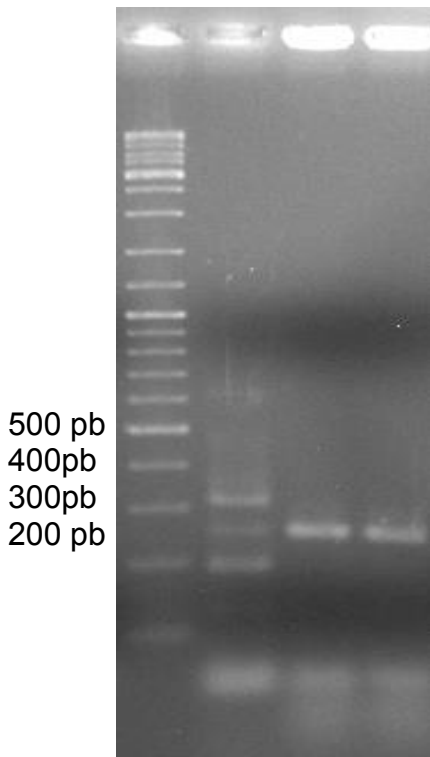


Pozo	Templado	Primers	Fragmento
1	NTC	LU3/LU5	----
2	Control positivo <i>L. salivarius</i> / <i>L. casei</i>	LU3/LU5	350 Y 400 pb
3	Pool 21	LU3/LU5	350 Y 400 pb
4	Pool 22	LU3/LU5	350 Y 400 pb
5	Pool 23	LU3/LU5	350 Y 400 pb
6	Control positivo <i>L. acidophilus</i>	L-aci	210 pb
7	Pool 21	L-aci	210 pb
8	Pool 22	L-aci	210 pb
9	Pool 23	L-aci	210 pb
10	MPM	---	-----

Figura 2.- PCR dúplex, se muestra un control positivo en el pozo 2, muestras en los pozos 3-5, control positivo de *L. acidophilus* en el pozo 6 y muestras en los pozos 7-9. El pozo 10 tiene el marcador de peso molecular (GeneRuler ADN Ladder Mix, Invitrogen). Gel de agarosa al 2.5%

PCR Múltiple

Para optimizar la identificación de algunas especies de lactobacilos se hizo una PCR múltiple con la finalidad de identificar 3 especies (*L. reuteri*, *L. plantarum* y *L. fermentum*) en una sola reacción, otras especies intentaron ser incluidas pero se veían desfavorecidas.

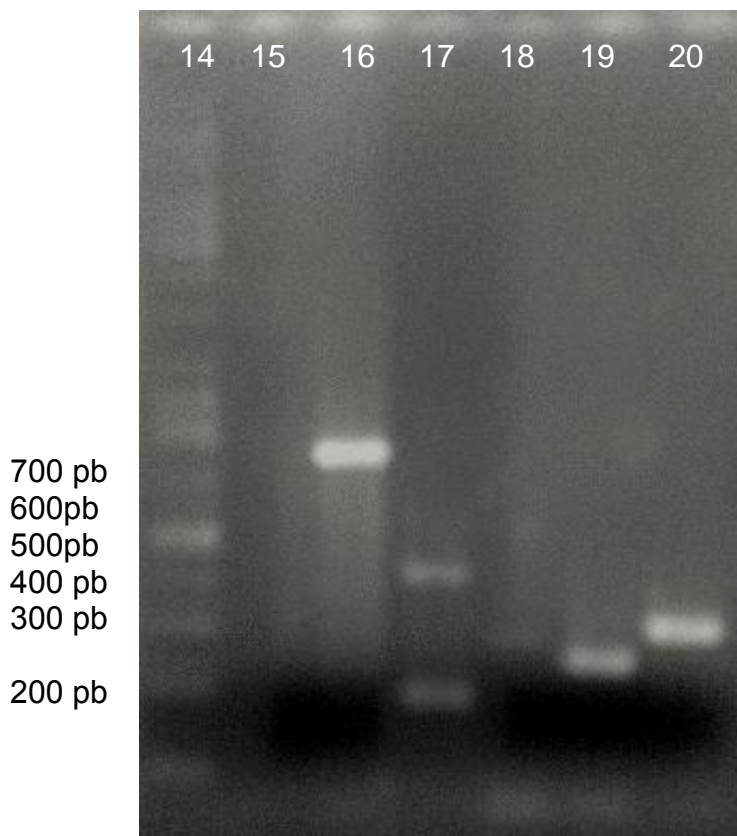


Pozo	Templado	Primers	Tamaños
10	MPM	-----	-----
11	Control positivo <i>L. reuteri</i> / <i>L. plantarum</i> / <i>L. fermentum</i>	L- reu/L-pla/L-fer	303, 248 y 192 pb
12	Pool 36	L- reu/L-pla/L-fer	303, 248 y 192 pb
13	Pool 37	L- reu/L-pla/L-fer	303, 248 y 192 pb

Figura 3.- PCR múltiple para la identificación de 3 especies de lactobacilos en una misma reacción. Pozo 10, marcador de peso molecular (GeneRuler ADN Ladder Mix, Invitrogen). Gel de agarosa al 2.5 %

PCR para especie

Cepas utilizadas como controles positivos para verificar el correcto funcionamiento de los respectivos pares de primers, algunas como *L. rhamnosus* (pozo 17) se ajustaron las condiciones de PCR para evitar la presencia de productos no deseados.



Pozo	Templado	Primers	Tamaño
14	MPM	---	-----
15	NTC	L-cas	----
16	<i>L. Casei</i>	L-cas	742 pb
17	<i>L.rhamnosus</i>	L-rha	190 pb
18	<i>L. salivarius</i>	L-sal	280 pb
19	<i>L. plantarum</i>	L-pla	248 pb
20	<i>L. reuteri</i>	L-reu	303 pb

Figura 4.-. Identificación de algunas especies de lactobacilos utilizando primers especie-específicos. Pozo 14 Marcador de Peso Molecular (GeneRuler ADN Ladder Mix, Invitrogen). Gel de agarosa 1.5 %

Análisis estadístico

Para desarrollar el análisis estadístico se realizaron 4 pruebas (U de Mann-Whitney, U de frecuencias, Kruskal-Wallis y chi cuadrada) de acuerdo a las características de los datos y categorías a analizar.

Índice de Masa Corporal (IMC) en activos y en sedentarios

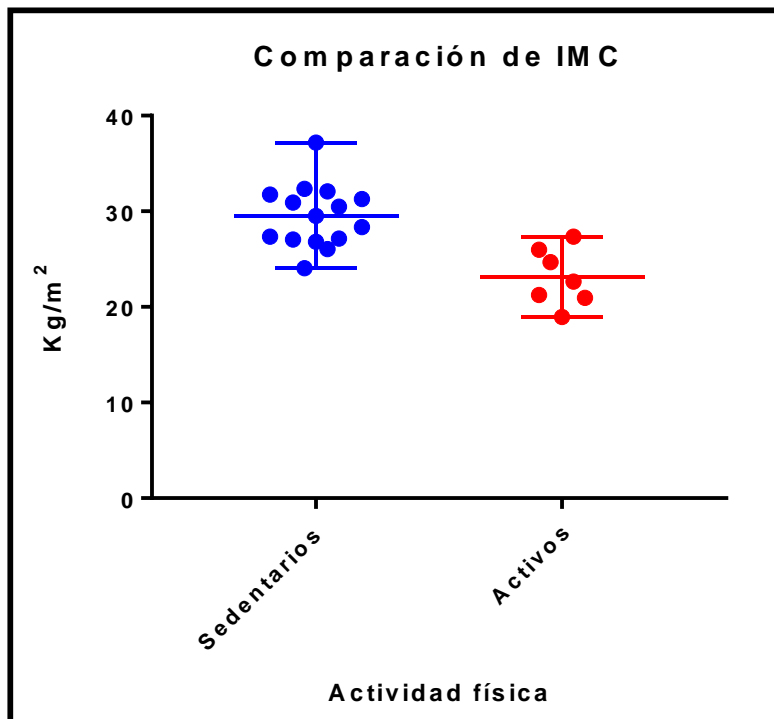


Figura 5.-Comparación del IMC entre pacientes activos y sedentarios, utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney ($p= 0.0005$) con un intervalo de confianza de 95%.

Frecuencia de especies de lactobacilos entre activos y sedentarios

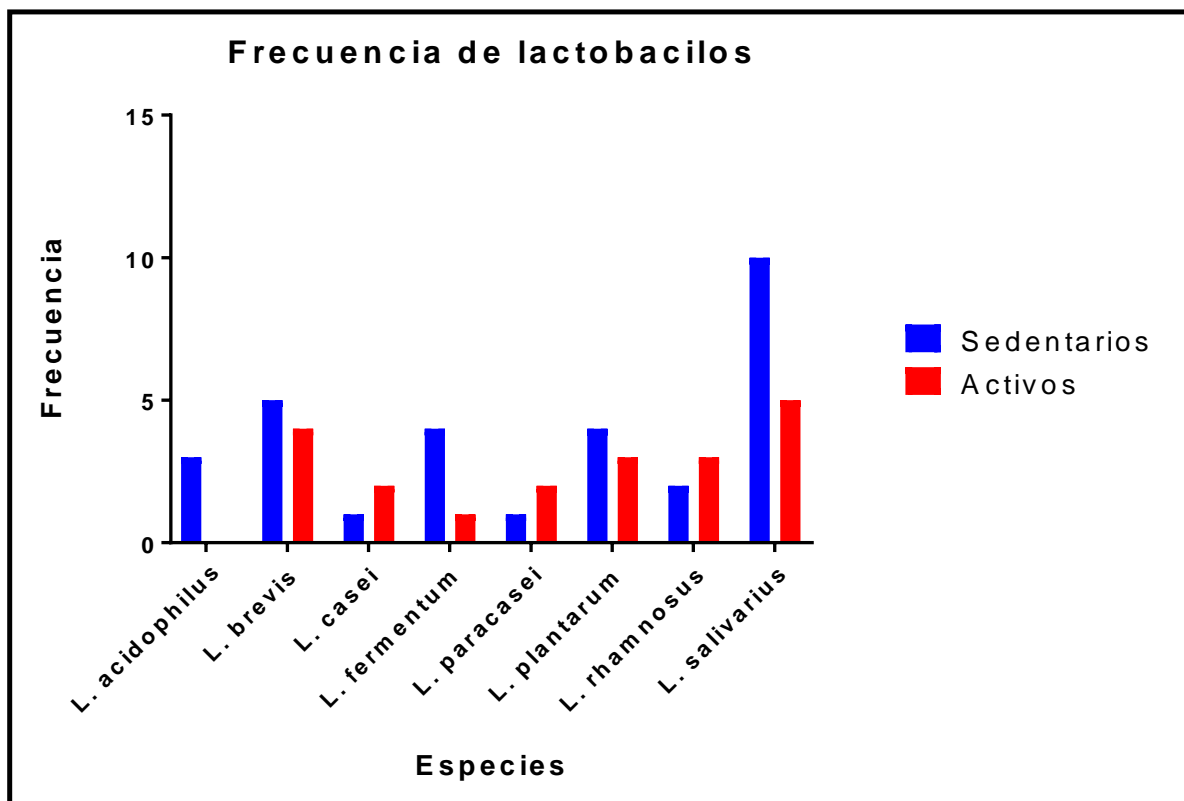


Figura 6.- comparación de las frecuencias de especies identificadas y agrupadas como pacientes sedentarios y activos, utilizando la prueba de chi cuadrada ($p=0.5609$) con un intervalo de confianza de 95 %

Apolipoproteínas

Apolipoproteínas E3 y E4 en sedentarios y en activos

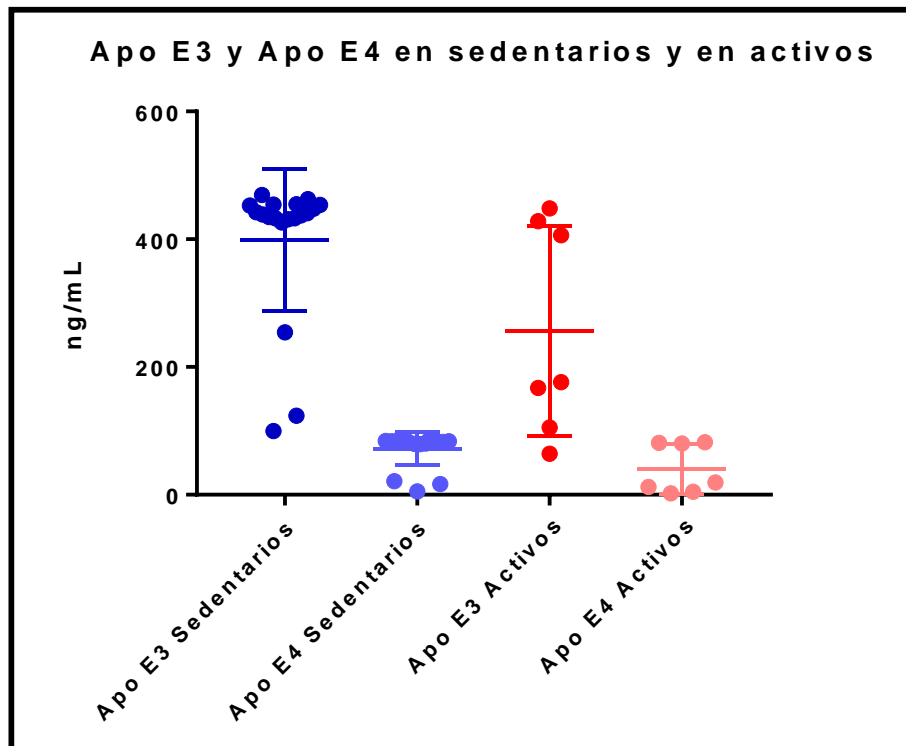


Figura 7.- Comparación de Apo E3 y Apo E4 tanto en sedentarios como en Activos utilizando una prueba no paramétrica (Kruskal- Wallis) con intervalo de confianza de 95 % ($p < 0.0001$)

Apolipoproteínas E3 y E4 en sedentarios

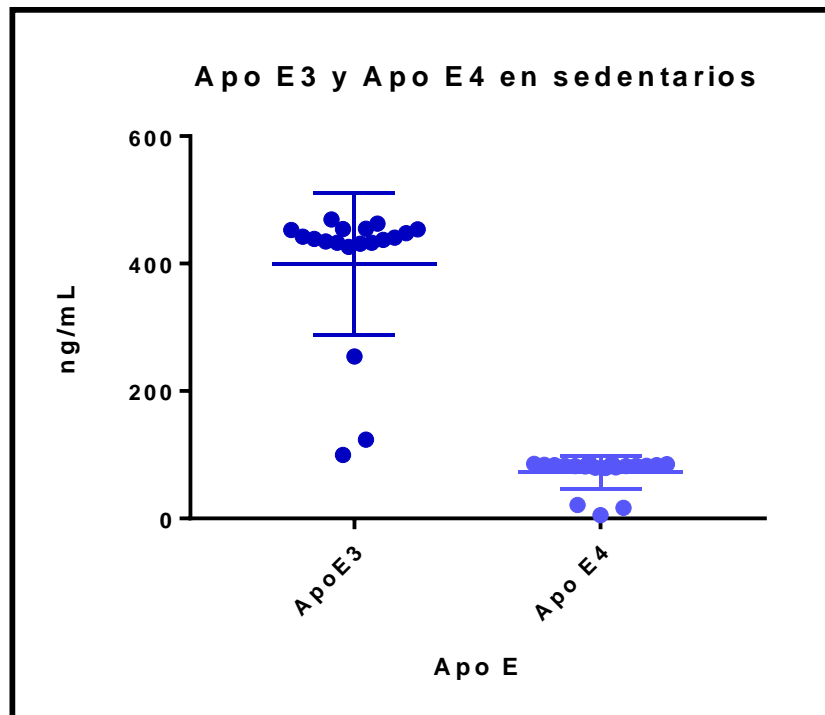


Figura 8.- Comparación de Apo E3 y Apo E4 en pacientes sedentarios mediante una prueba estadística de U de Mann-Whitney ($p < 0.001$), con un intervalo de confianza de 95 %

Apolipoproteínas E3 y E4 en pacientes activos

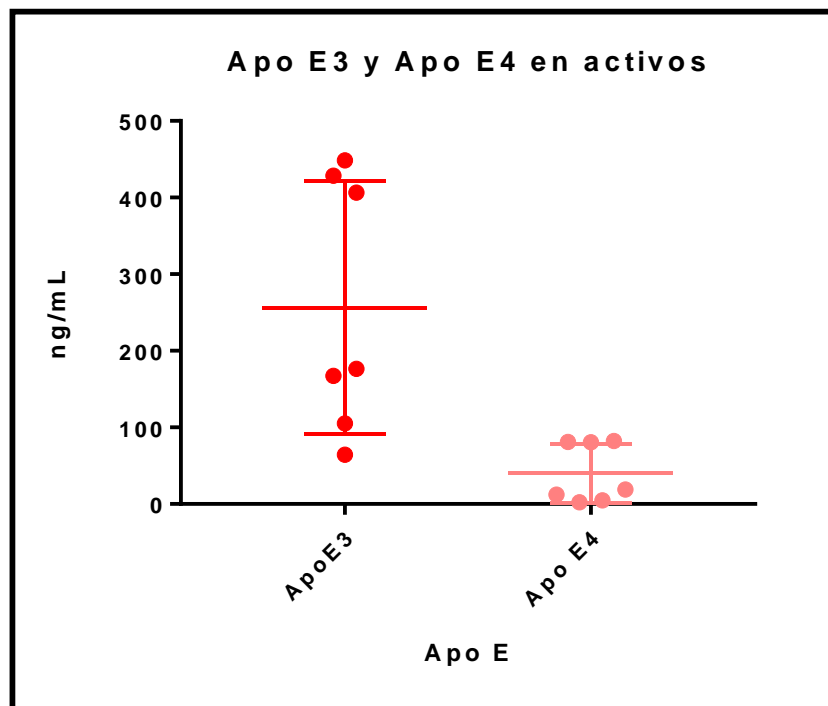


Figura 9.- Comparación de Apo E3 y Apo E4 en pacientes activos utilizando una prueba de U de Mann-Whitney ($p = 0.0041$) con el 95 % de confianza

Apolipoproteína E4 en pacientes sedentarios y en activos

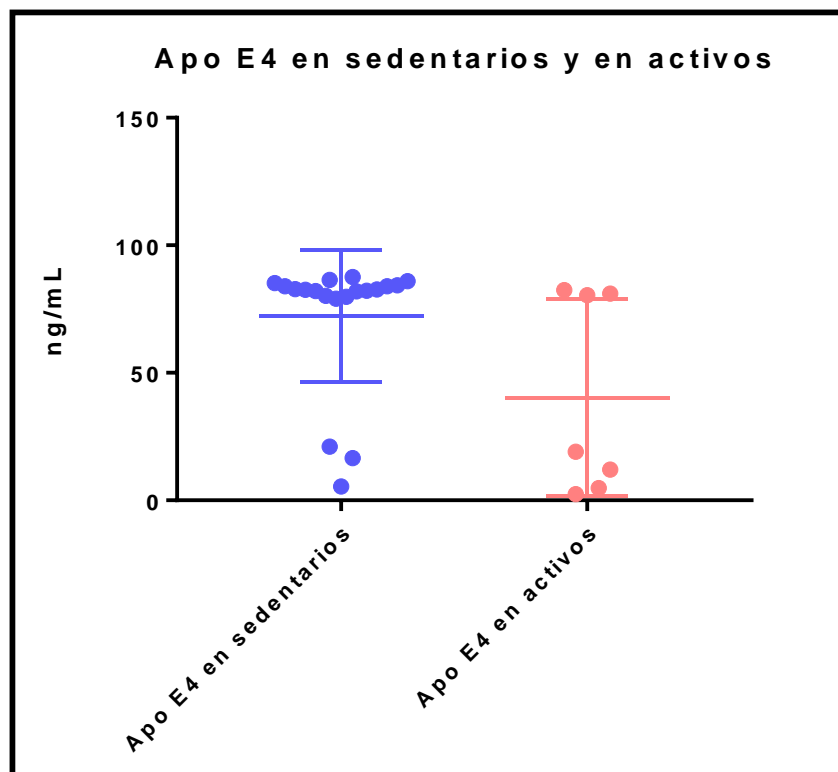


Figura 11.- Comparación de Apo E4 en pacientes sedentarios y con actividad física, con un intervalo de confianza del 95 % y utilizando la prueba de U de Mann-Whitney ($p= 0.0125$)

Apolipoproteína E3 en sedentarios con Apolipoproteína E4 en activos

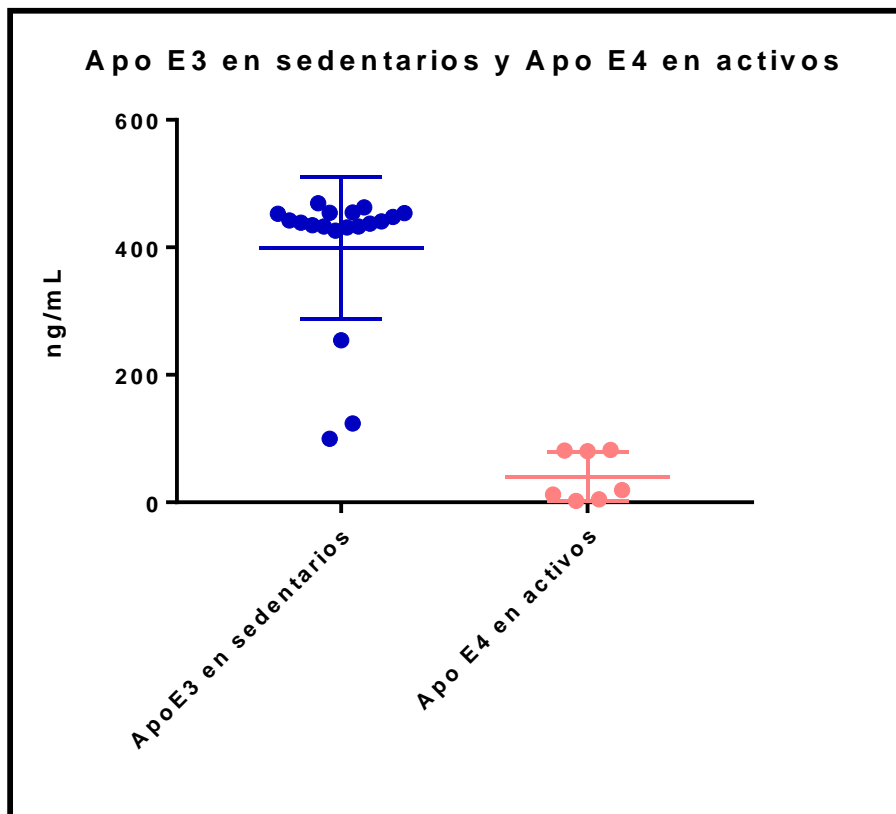


Figura 12.- Comparación de Apo E3 en pacientes sedentarios y Apo E4 en pacientes con actividad física, utilizando una prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0.0001$) con un intervalo de confianza de 95 %

Apolipoproteína E4 en sedentarios con Apolipoproteína E3 en activos

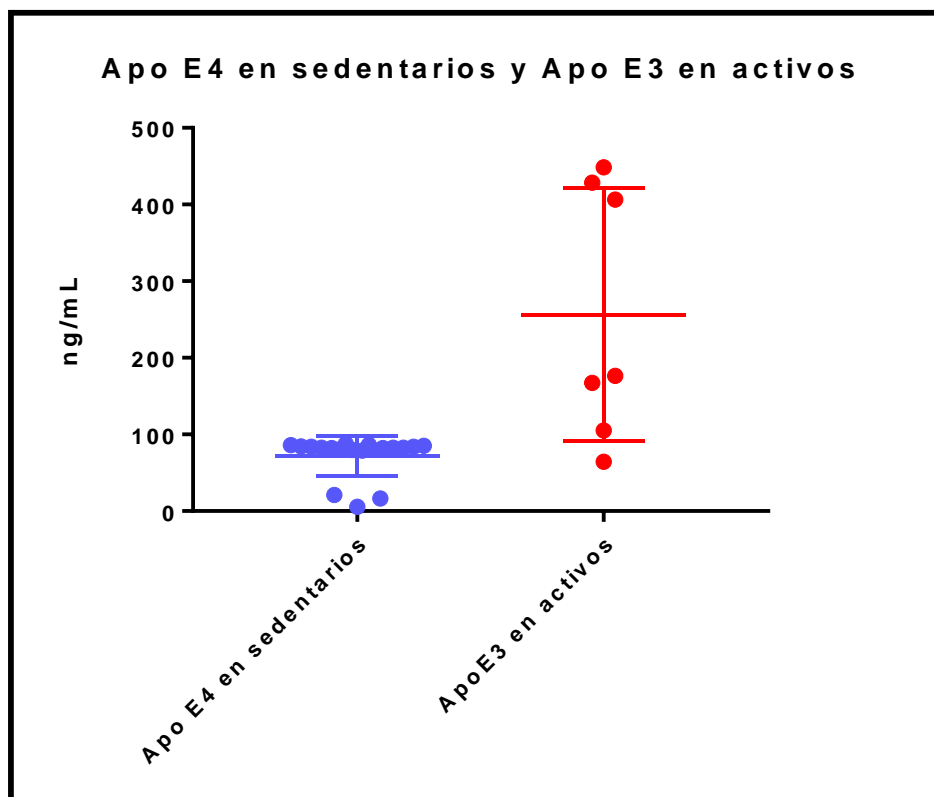


Figura 13.- Comparación de Apo E4 en sedentarios y Apo E3 en activos, utilizando la prueba de U de Mann-Whitney ($p=0.0022$) con el 95 % de confianza

Perfil de lípidos

Colesterol total entre activos y sedentarios

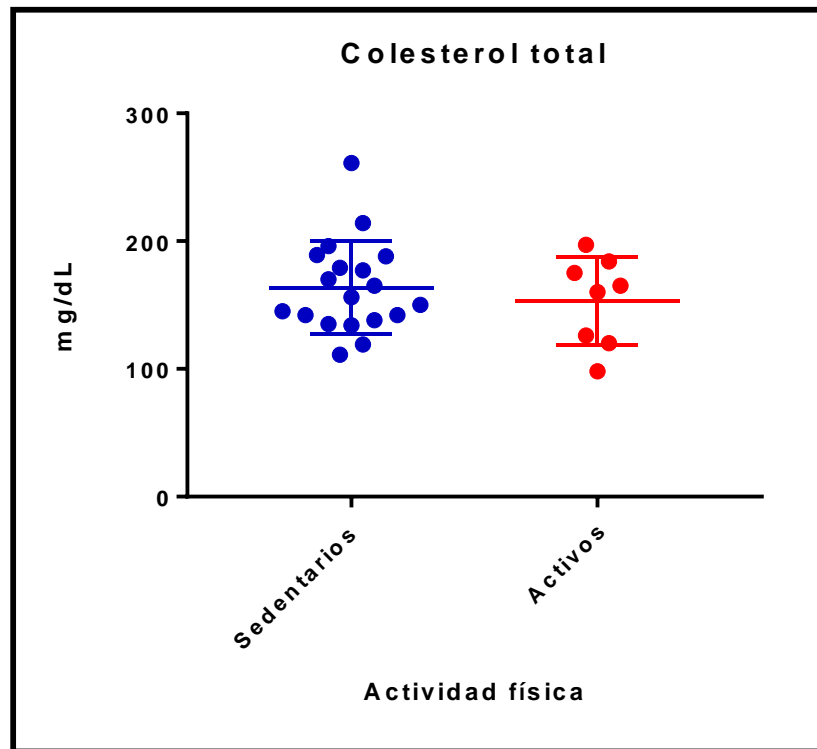


Figura 14.- comparación de Colesterol total entre pacientes sedentarios y activos, utilizando la prueba de U de Mann-Whitney ($p = 0.6677$) con un intervalo de 95 % de confianza

Colesterol HDL en activos y sedentarios

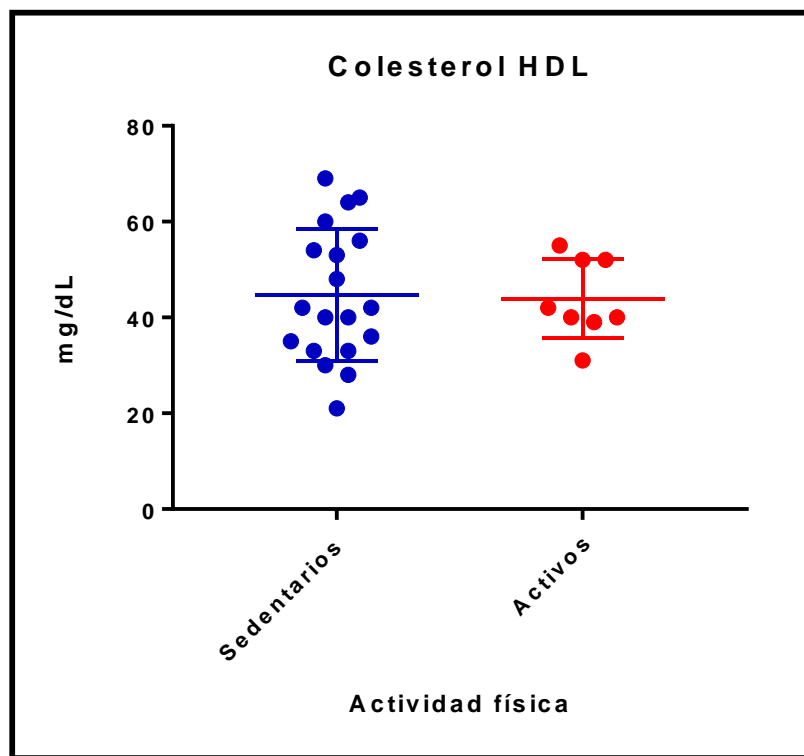


Figura 15.- comparación de colesterol HDL en pacientes sedentarios y activos, utilizando la prueba de U de Mann-Whitney ($p= 0.9274$) con un intervalo de confianza de 95 %

Colesterol VLDL entre sedentarios y activos

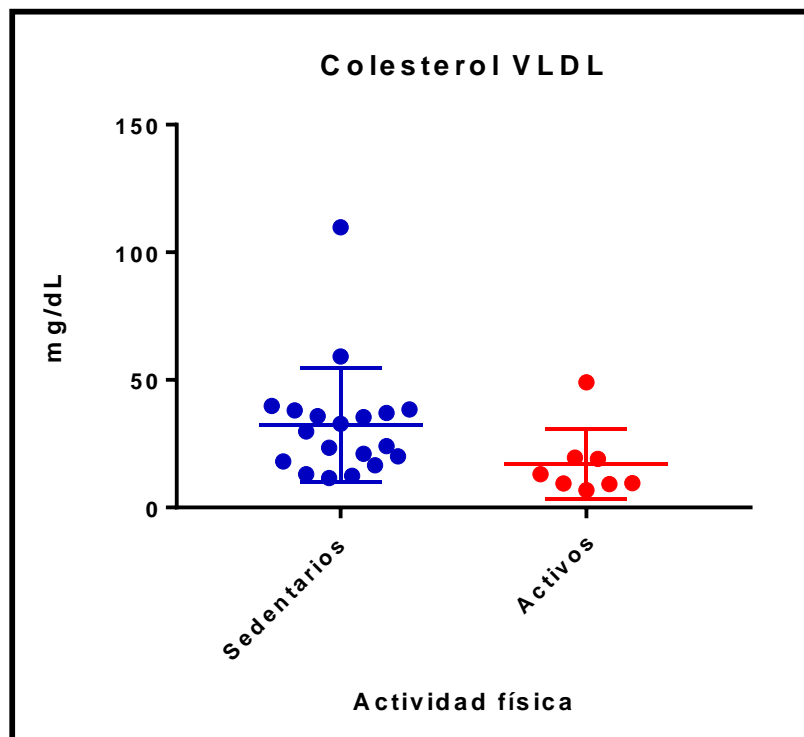


Figura 17.- Comparación de colesterol VLDL entre pacientes sedentarios y activos a través de una prueba de U (p= 0.0116) de Mann-Whitney con intervalo de confianza de 95%

Triglicéridos entre sedentarios y activos

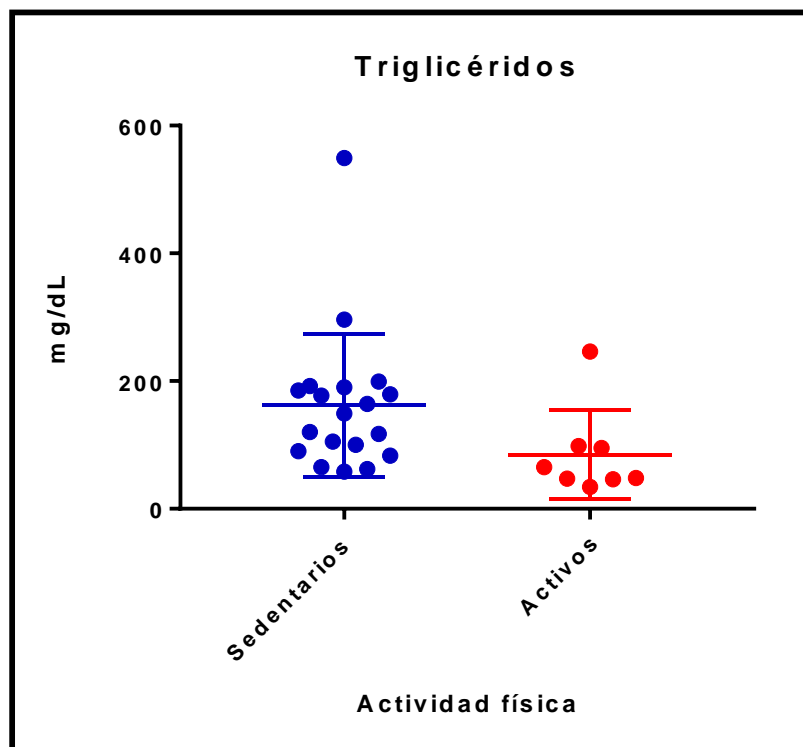


Figura 18.- comparación de Triglicéridos en pacientes sedentarios y activos utilizando una prueba de U de Mann- Whitney ($p= 0.0116$) con un intervalo de confianza de 95 %

Comparación de las especies de lactobacilos en función de los resultados del perfil de lípidos

Especies de lactobacilos en pacientes con colesterol normal y elevado

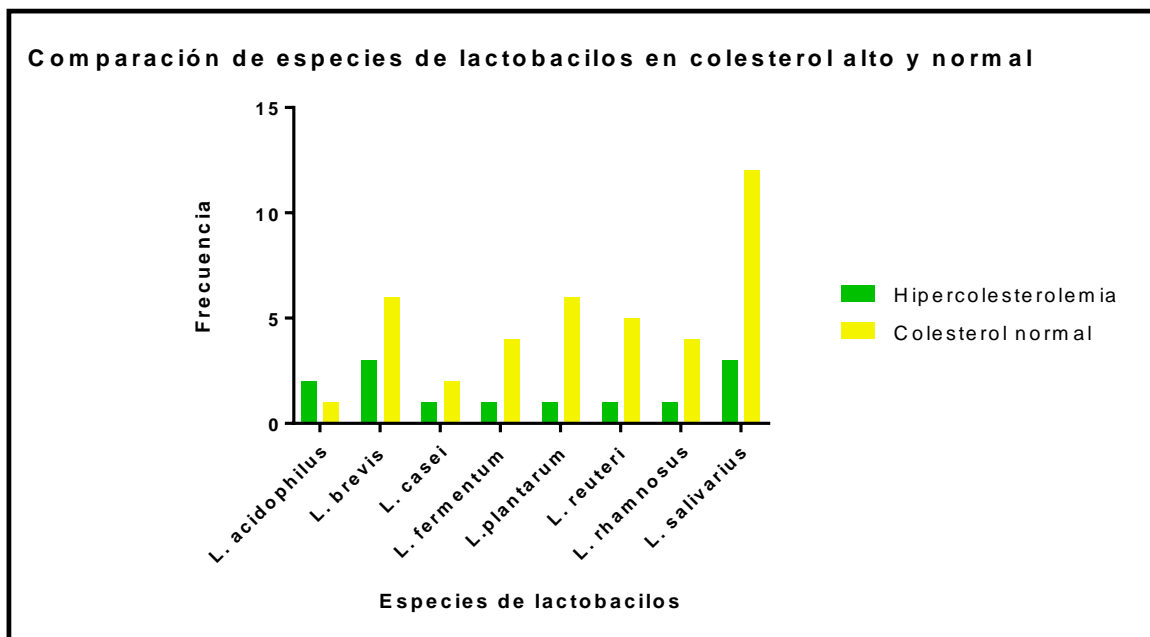


Figura 19.- Comparación de especies de lactobacilos identificadas en pacientes con colesterol alto y aquellos con colesterol normal, sin tomar en cuenta la actividad física que realizan. Se realizó una prueba de chi cuadrada ($p= 0.7501$) con un intervalo de 95 % de confianza

Especies de lactobacilos en pacientes con triglicéridos altos y normales

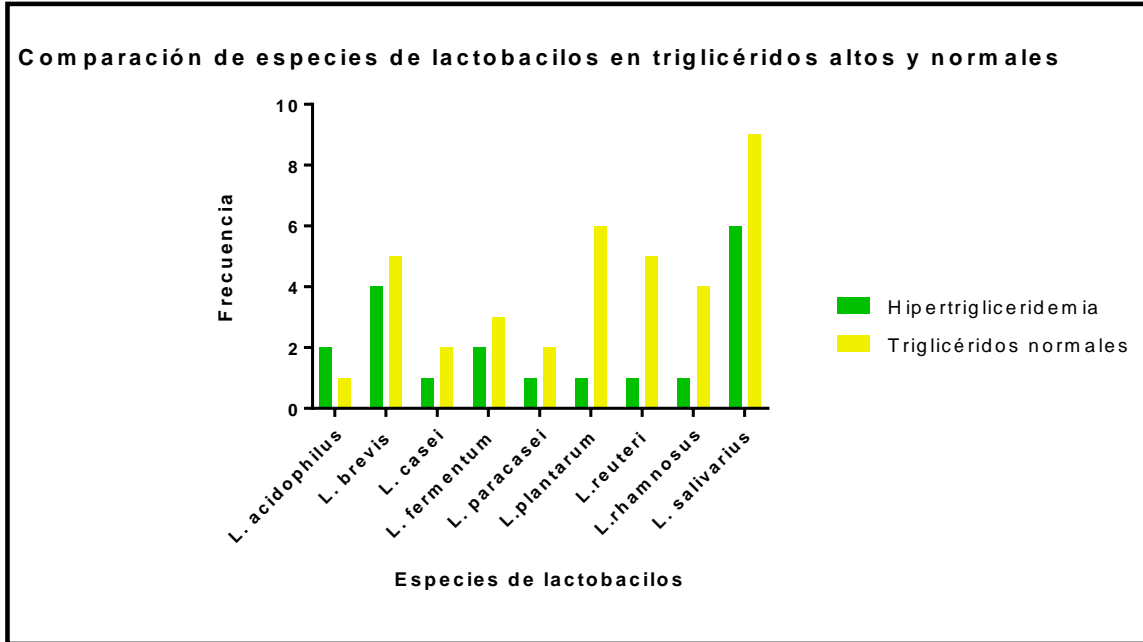


Figura 20.- comparación de las especies de lactobacilos identificadas independientemente de su actividad física, tomando como criterio si los valores de triglicéridos son altos o normales. Se utilizó una prueba estadística de chi cuadrada ($p= 0.7949$) con el 95 % de confianza.

Especies de lactobacilos en pacientes con colesterol LDL normal y alto

Niveles de LDL			
Alto	Frecuencia	Normal	Frecuencia
<i>L. acidophilus</i>	1	<i>L. acidophilus</i>	2
<i>L. brevis</i>	1	<i>L. brevis</i>	8
<i>L. casei</i>	0	<i>L. casei</i>	3
<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	4
<i>L. paracasei</i>	0	<i>L. paracasei</i>	3
<i>L. plantarum</i>	0	<i>L. plantarum</i>	7
<i>L. reuteri</i>	0	<i>L. reuteri</i>	6
<i>L. rhamnosus</i>	0	<i>L. rhamnosus</i>	5
<i>L. salivarius</i>	1	<i>L. salivarius</i>	14

Tabla 1.- Comparación de los niveles de colesterol LDL entre pacientes que tienen valores elevados con aquellos que son normales, mediante el uso de U de frecuencias ($p<0.0001$) con un intervalo de confianza de 95 %

Especies de lactobacilos en pacientes con colesterol HDL normal y bajo

Niveles de HDL			
Bajo	Frecuencia	Normal	Frecuencia
<i>L. acidophilus</i>	0	<i>L. acidophilus</i>	3

<i>L. brevis</i>	1	<i>L. brevis</i>	8
<i>L. casei</i>	0	<i>L. casei</i>	3
<i>L. fermentum</i>	2	<i>L. fermentum</i>	3
<i>L. paracasei</i>	0	<i>L. paracasei</i>	3
<i>L. plantarum</i>	1	<i>L. plantarum</i>	6
<i>L. reuteri</i>	1	<i>L. reuteri</i>	5
<i>L. rhamnosus</i>	0	<i>L. rhamnosus</i>	5
<i>L. salivarius</i>	1	<i>L. salivarius</i>	14

Tabla 2.- Comparación de los niveles de colesterol HDL entre pacientes con niveles normales y bajos, utilizando una prueba de U de frecuencias ($p < 0.0001$) con un intervalo de confianza de 95 %

Especies de lactobacilos en pacientes con colesterol VLDL normal y alto

Niveles de VLDL			
Alto	Frecuencia	Normal	Frecuencia
<i>L. acidophilus</i>	0	<i>L. acidophilus</i>	3
<i>L. brevis</i>	1	<i>L. brevis</i>	8
<i>L. casei</i>	1	<i>L. casei</i>	2
<i>L. fermentum</i>	0	<i>L. fermentum</i>	5
<i>L. paracasei</i>	0	<i>L. paracasei</i>	3
<i>L. plantarum</i>	1	<i>L. plantarum</i>	6
<i>L. reuteri</i>	0	<i>L. reuteri</i>	6
<i>L. rhamnosus</i>	0	<i>L. rhamnosus</i>	5
<i>L. salivarius</i>	1	<i>L. salivarius</i>	14

Tabla 3.- Comparación de los niveles de colesterol VLDL entre pacientes con niveles normales y altos, mediante una prueba de U de frecuencias ($p < 0.0001$) con un intervalo de confianza de 95 %

Comparación de las especies de lactobacilos en función del consumo de probióticos y prebióticos

Especies de lactobacilos de acuerdo al consumo regular o escaso de probióticos tanto en sedentarios como en activos

Consumo de probióticos							
Sedentarios				Activos			
Regular	Frecuencia	Escaso	Frecuencia	Regular	Frecuencia	Escaso	Frecuencia
<i>L. acidophilus</i>	2	<i>L. acidophilus</i>	1	<i>L. acidophilus</i>	0	<i>L. acidophilus</i>	0
<i>L. brevis</i>	4	<i>L. brevis</i>	1	<i>L. brevis</i>	3	<i>L. brevis</i>	1
<i>L. casei</i>	0	<i>L. casei</i>	1	<i>L. casei</i>	2	<i>L. casei</i>	0
<i>L. fermentum</i>	3	<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	0
<i>L. paracasei</i>	1	<i>L. paracasei</i>	0	<i>L. paracasei</i>	2	<i>L. paracasei</i>	0
<i>L. plantarum</i>	4	<i>L. plantarum</i>	0	<i>L. plantarum</i>	2	<i>L. plantarum</i>	1

<i>L. reuteri</i>	5	<i>L. reuteri</i>	0	<i>L. reuteri</i>	1	<i>L. reuteri</i>	0
<i>L. rhamnosus</i>	2	<i>L. rhamnosus</i>	0	<i>L. rhamnosus</i>	3	<i>L. rhamnosus</i>	0
<i>L. salivarius</i>	9	<i>L. salivarius</i>	1	<i>L. salivarius</i>	4	<i>L. salivarius</i>	1

Tabla 4.- relación del consumo de probióticos en pacientes con actividad física y sedentarios, clasificados en consumo regular y escaso, utilizando una prueba de U de frecuencias con un intervalo de 95%

Especies de lactobacilos de acuerdo al consumo regular o escaso de prebióticos tanto en sedentarios como en activos

Consumo de prebióticos							
Sedentarios				Activos			
Regular	Frecuencia	Escaso	Frecuencia	Regular	Frecuencia	Escaso	Frecuencia
<i>L. acidophilus</i>	3	<i>L. acidophilus</i>	0	<i>L. acidophilus</i>	0	<i>L. acidophilus</i>	0
<i>L. brevis</i>	5	<i>L. brevis</i>	0	<i>L. brevis</i>	2	<i>L. brevis</i>	2
<i>L. casei</i>	1	<i>L. casei</i>	0	<i>L. casei</i>	1	<i>L. casei</i>	1
<i>L. fermentum</i>	3	<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	0
<i>L. paracasei</i>	1	<i>L. paracasei</i>	0	<i>L. paracasei</i>	2	<i>L. paracasei</i>	0
<i>L. plantarum</i>	4	<i>L. plantarum</i>	0	<i>L. plantarum</i>	1	<i>L. plantarum</i>	2
<i>L. reuteri</i>	4	<i>L. reuteri</i>	1	<i>L. reuteri</i>	1	<i>L. reuteri</i>	0
<i>L. rhamnosus</i>	2	<i>L. rhamnosus</i>	0	<i>L. rhamnosus</i>	2	<i>L. rhamnosus</i>	1
<i>L. salivarius</i>	9	<i>L. salivarius</i>	1	<i>L. salivarius</i>	5	<i>L. salivarius</i>	0

Tabla 5.- Relación del consumo de prebióticos en pacientes con actividad física y sedentarios, clasificados en consumo regular y escaso, utilizando una U de frecuencias con un intervalo de 95%

Especies de lactobacilos de acuerdo al consumo regular o escaso de prebióticos y probióticos tanto en sedentarios como en activos

Consumo de prebióticos y probióticos							
Sedentarios				Activos			
Regular	Frecuencia	Escaso	Frecuencia	Regular	Frecuencia	Escaso	Frecuencia
<i>L. acidophilus</i>	2	<i>L. acidophilus</i>	1	<i>L. acidophilus</i>	0	<i>L. acidophilus</i>	0
<i>L. brevis</i>	4	<i>L. brevis</i>	1	<i>L. brevis</i>	2	<i>L. brevis</i>	2
<i>L. casei</i>	0	<i>L. casei</i>	1	<i>L. casei</i>	1	<i>L. casei</i>	1
<i>L. fermentum</i>	3	<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	0
<i>L. paracasei</i>	1	<i>L. paracasei</i>	0	<i>L. paracasei</i>	2	<i>L. paracasei</i>	0
<i>L. plantarum</i>	4	<i>L. plantarum</i>	0	<i>L. plantarum</i>	1	<i>L. plantarum</i>	2
<i>L. reuteri</i>	5	<i>L. reuteri</i>	0	<i>L. reuteri</i>	1	<i>L. reuteri</i>	0
<i>L. rhamnosus</i>	2	<i>L. rhamnosus</i>	0	<i>L. rhamnosus</i>	2	<i>L. rhamnosus</i>	1

<i>L. salivarius</i>	9	<i>L. salivarius</i>	1	<i>L. salivarius</i>	5	<i>L. salivarius</i>	0
----------------------	---	----------------------	---	----------------------	---	----------------------	---

Tabla 6.- Relación del consumo de Pre y probióticos en pacientes con actividad física, clasificados como de consumo regular y escaso, utilizando una U de frecuencias con un intervalo de 95%

Discusión:

El objetivo principal de este trabajo fue conjeturar si los lactobacilos tienen un efecto antiaterosclerótico en los seres humanos. Para ello se comenzó por determinar el genotipo de Apo E. Como se ha reportado en diversos artículos^{12, 24, 25,26} los resultados para el genotipo fueron en su mayoría para Apo E3/E3 (38 pacientes), en segundo lugar para Apo E3E4 (27 pacientes) y en menor cantidad para Apo E2/E3 y E4/E4 (3 y 1 respectivamente). Estos resultados eran de esperarse ya que corresponde a lo reportado por varios autores en la población mexicana^{27, 28}.

A los pacientes que tenían el genotipo que de interés en este estudio, se les pidió que proporcionaran una muestra de materia fecal con la finalidad de aislar a los lactobacilos. Para poder aislarlos de forma eficiente, se le adicionó al medio 0.15 %de bilis , debido a que al inocular microorganismos comunes de la microbiota tuvieron la capacidad de crecer y podían representar un problema, se intentó con un antibiótico al que los lactobacilos son resistentes (vancomicina) y la acidificación del medio, pero no se obtuvieron resultados favorables (Anexos), excepto con bilis, que fue probada a diferentes concentraciones (0.10, 0.15, 0.30 y 0.50 %) para establecer la óptima que permita el crecimiento de las especies de lactobacilos buscados.

Al identificar lactobacilos mediante PCR punto final en varios pacientes se identificó más de una especie, lo que sugiere una alimentación variada en el paciente y un efecto benéfico mayor sobre su metabolismo.

Al realizar el perfil de lípidos se encontró que algunos pacientes a pesar de tener una rutina de ejercicio presentaban problemas de colesterol o triglicéridos, quizá debido a sus malos hábitos alimenticios o en algunos casos a la expresión de Apo E 4. Así como también se esperaba en sedentarios valores por encima de los normales debido a su inactividad física.

Cuando se comparó el IMC entre activos y sedentarios (figura 1) evidentemente hubo una diferencia muy marcada debido a la actividad física.

Se realizó un pareo entre las especies de lactobacilos detectadas en pacientes activos contra las de pacientes sedentarios y no se encontró diferencia significativa, es decir, la actividad física no tiene relación con las especies de lactobacilos que colonizan al individuo.

Durante la comparación de las concentraciones de Apo E3 y Apo E4 tanto en sedentarios como en activos, se estableció una diferencia entre los cuatro grupos (Apo E3 en sedentarios, Apo E3 en activos, Apo E4 en sedentarios y Apo E4 en activos).

La comparación entre Apo E3 y E4 en pacientes sedentarios así como en activos ha demostrado una clara diferencia, por lo que se confirma que el nivel de Apo E principalmente Apo E4 sí va a influir en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares principalmente en pacientes sedentarios.

Cuando se compararon los niveles de Apo E3 en sedentarios y en activos y los niveles de Apo E4 en los mismos grupos, se encontró una diferencia por lo que se deduce que los niveles de Apo E sí se van a ver influenciados por la actividad física como era de esperarse.

También se llevó a cabo la comparación de Apo E3 en sedentarios contra Apo E4 en activos (figura 8) y Apo E4 en sedentarios con Apo E3 en activos (figura 9) para ver si las 2 isoformas de la Apolipoproteína E se veían influenciadas por el estilo de vida y si la expresión de las dos isoformas de la proteína son diferentes, lo cual se puso en evidencia en ambas figuras.

A pesar de que los análisis de Apo E mostraron valores significativos no se puede establecer si los resultados se encuentran dentro del rango normal, ya que no hay reportes de esto para la población mexicana ni a nivel mundial, por lo que se requiere el muestreo de más pacientes para poder establecer un valor de referencia.

Se hizo el cotejo entre los valores obtenidos de colesterol en sedentarios y en activos, mostrando que estos niveles no se ven influenciados por la actividad física.

Se compararon los resultados de colesterol HDL entre activos y sedentarios arrojando al igual que el colesterol total no se mostró modificado por la actividad física.

El colesterol LDL fue contrastado en sedentarios con activos, al realizar el análisis estadístico indica no haber una diferencia importante.

Sin embargo se hizo el pareo entre los activos y sedentarios para colesterol VLDL, demostrando haber un efecto del ejercicio en esta molécula, así como también se manifestó la misma tendencia con los triglicéridos. Estos resultados nos sugieren que tanto el colesterol VLDL y triglicéridos se ven reducidos al practicar alguna actividad física.

En síntesis, llevar a cabo una actividad física va a influenciar el IMC, los niveles de Apolipoproteínas E3 y E4 así como colesterol VLDL y triglicéridos, pero no en la presencia de especies de lactobacilos.

Posteriormente se efectuaron análisis estadístico sin tomar en cuenta la actividad física y el criterio para tomar en cuenta fue si los valores del perfil de lípidos estaban

dentro de los valores de referencia o por encima de éstos, la única excepción fue en el caso del colesterol HDL ya que no hubo valores por encima de lo normal, sino por debajo de éstos, recordemos que niveles bajos de HDL sugieren una escasa actividad física y que además el colesterol HDL es protector ya que es el encargado de transportar el colesterol que se deposita en las arterias, de regreso al hígado y así ser metabolizado y excretado a través de las sales biliares^{7,8,18}.

El resultado de la frecuencia con la que se detectaron las diferentes especies de lactobacilos entre los pacientes que poseen niveles normales de colesterol total y los que se encuentran elevados, muestra que no hubo diferencia ($p= 0.7501$), siendo la misma situación para los triglicéridos ($p= 0.7949$)

Sin embargo al comparar las fracciones de colesterol (HDL, LDL y VLDL) con el mismo criterio, hubo una clara diferencia ($p<0.0001$), lo que permite deducir que la presencia de especies de lactobacilos sí tiene un efecto en los niveles de colesterol HDL, LDL y VLDL, como en muchos estudios se ha reportado, en éste se ha confirmado esta idea, además en publicaciones diversas se ha trabajado con ratones, con quienes es más fácil controlar factores como la dieta que van a influir en la presencia de lactobacilos, caso contrario de los seres humanos, ya que aquí no se les controló la dieta o se monitorearon sus hábitos. Además esto tiene sentido porque los niveles normales del perfil de lípidos indican una alimentación buena o ideal que sumado a una dieta con alimentos ricos en probióticos y prebióticos, puede ser una medida profiláctica ante una eventual enfermedad cardiovascular.

Al comparar el consumo de probióticos entre sedentarios y activos, mostró una diferencia ($p= 0.023$) en los que lo ingerían de forma regular, mientras que no hubo esta tendencia ($p>0.05$) en los que los comen escasamente .

En el caso de los prebióticos, contrasta con el anterior dado que en el consumo regular de prebióticos no hubo diferencia ($p>0.05$), y en los que consumen de forma escasa sí estuvo la discrepancia ($p=0.01$).

Al examinar en conjunto la ingesta de pre y probióticos los resultados sugieren que sí hay una diferencia ($p= 0.0157$) entre activos y sedentarios en la dieta regular, por otro lado en el consumo escaso no se manifiesta el mismo resultado ($p> 0.05$). El principal aporte de este trabajo fue mostrar que la colonización con diversas especies de lactobacilos tiene un efecto cardioprotector dado que estas bacterias parecen disminuir los niveles de colesterol LDL y VLDL (asociados a aterosclerosis) y mantener en un nivel normal al colesterol HDL

Conclusiones:

La actividad física no mostró influir sobre la presencia de las especies de lactobacilos buscadas, pero sí hubo un efecto sobre las apolipoproteínas, colesterol VLDL, triglicéridos y el IMC, Siendo factores que generan riesgo vascular. Sin embargo al analizar las especies de lactobacilos identificadas en pacientes que

tenían niveles de colesterol LDL, HDL y VLDL se presentó una diferencia, lo que indica que hay una influencia de estos microorganismos sobre las enfermedades cardiovasculares, por lo que sí se demuestra lo que se propuso durante el proyecto.

Además es importante ingerir prebióticos, debido a que éstos van a estimular la presencia de probióticos, incluidos los lactobacilos.

Las 9 especies de lactobacilos han demostrado reducir el colesterol, más no son las únicas presentes en la microbiota, asimismo hay microorganismos que favorecen la aterogénesis.

Aunque haya personas con un riesgo genético a desarrollar enfermedades cardiovasculares, no quiere decir que ya es un hecho que en alguna etapa de su vida se va a presentar, puesto que factores como la alimentación o la actividad física van a ser determinantes en la presencia de dichos trastornos.

Bibliografía

1. - Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. Multiple Cause of Death 1999-2015 on CDC WONDER Online Database,

released December 2016. Data are from the Multiple Cause of Death Files, 1999-2015, as compiled from data provided by the 57 vital statistics jurisdictions through the Vital Statistics Cooperative Program. Accessed at <http://wonder.cdc.gov/mcd-icd10.html>

2.-Naruszewicz M., Johansson M., Zapolska-Downar D., and Bukowska H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *American Journal for Clinical Nutrition*, 76, 1249-55

3. – Wu J. M., Tze-chen H., Wang Z. (2011). Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 1(1), 10.

4.-Brand K., Page S., Rogler G., Bartsch A., Brandl R., Knuechel R., et al. (1996). Activated Transcription Factor Nuclear Factor- κ B Is Present in the Atherosclerotic Lesion. *Journal of Clinical Investigation*, 97, 8.

5. - Barakat. Abdul I. (2013). Blood flow and arterial endothelial dysfunction: Mechanisms and implications. *Comptes Rendus Physique*, 14, 18.

6. - F. Ascaso Juan. (2016). Inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the treatment of hypercholesterolemia. *Endocrinología y nutrición*, 63: 3.

7.- Errico T.L., Chen X., Campos M., J.M., Julve J., Escolà-Gil J.C., Blanco-Vaca F. (2013). Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clínica e Investigación en Aterosclerosis*, 25, (2): 6

8. - Ponce Gutiérrez Y., Ponce Gutiérrez A., Rodríguez León A. y Llanes Álvarez C. (Octubre-Diciembre 2013). Las lipoproteínas de alta densidad: protectoras vasculares contra la aterosclerosis. *Corsalud*, 5, 366-378.

9. - Mahley Robert W., Weisgraber Karl H. and Huang Yadong. (December 22, 2008.). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of Lipid Research*, April 2009, 6

10.- El-Lebedy D., Raslan H. M. and Mohammed A. M.. (2016). Apolipoprotein E gene polymorphism and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, 15, 11

11. - Ott, S. J. *et al.* Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation* 113, 929–937 (2006).

12. - . Koren, O. *et al.* Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108 (Suppl. 1), 4592–4598 (2011).

13.-Gregory Jill C., Buffa Jennifer A., Org Elin, et al. (February 27, 2015). Transmission of Atherosclerosis Susceptibility with Gut Microbial Transplantation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 290, 5647-5660.

17.-Lindskog Jonsson Annika and Bäckhed Fredrik. (December 2016). Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nrcardio*, 183, 9.

- 14.-Barrington William T. and Lusis Aldons J. (3 November 2107). Association between the gut microbiome and atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, 169, 2.
- 15.-Koren Omry, Spor Aymé, Felinb Jenny, Fåk Frida, Stombaugh Jesse, Tremaroli Valentina, et al. (August 2, 2010). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *PNAS*, 108, 4592–4598.
- 16.-Fu Jingyuan, Bonder Marc Jan, Cenit María Carmen, Tigchelaar Ettje F., Maatman Astrid, A.M. Dekens Jackie, et al. (2015). The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids. *Circulation Research*, October, 26.
- 17.-L.R. Portugal, J.L. Gonçalves, L.R. Fernandes, H.P.S. Silva, R.M.E. Arantes, J.R. Nicoli, et al. (2006). Effect of *Lactobacillus delbrueckii* on cholesterol metabolism in germ-free mice and on atherogenesis in apolipoprotein E knock-out mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39, 629-635
- 18.-M. T. Liong and N. P. Shah. (2005). Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of *Lactobacilli* Strains. *Journal of Dairy Science*, Vol. 88, No. 1, 55-66.
19. - Fak Frida, Backhed Fredrik. (2012). *Lactobacillus reuteri* Prevents Diet-Induced Obesity, but not Atherosclerosis, in a Strain Dependent Fashion in Apoe2/2 Mice. *PLoS ONE*, vol 7, issue 10, 8.
- 20.-Hidetoshi Morita, Hidehiro Toh, Shinji Fukuda, Hiroshi Horikawa, Kenshiro Oshima, Takehito Suzuki, et al. (2008). Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* Reveal a Genomic Island for Reuterin and Cobalamin Production. *DNA Research*, Vol. 15, No. 3, 151-161.
- 21.-Ganguly Paul and Fatima Alam Sreyoshi. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal*, Vol. 14 No. 6, 1-10.
- 22.-H.-S. Lye, G. Rusul, and M.-T. Liong. (2010). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*, Vol. 93 No. 4, 1383-1392.
- 23.- Song Yu-Li, Kato Naoki, Liu Cheng-Xu, Matsumiya Yoshiko, Kato Haru, Watanabe Kunitomo. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 187, 167-173.
- 24.-Koopal C., Geerlings M. I., Muller M., de Borst G.J., Algra A., Van der Graaf Y., et al.. (2015). The relation between apolipoprotein E (APOE) genotype and peripheral artery disease in patients at high risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 246, 187-192.
- 25.- Greenow K. Pearce N. J., Ramji D. P.. (2005). The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 83, 329-342.

26.- Torres-Perez E., Ledesma M., Garcia-Sobreviela M. P., Leon-Latre M., Arbones-Mainar J. M.. (2015). Apolipoprotein E4 association with metabolic syndrome depends on body fatness. *Atherosclerosis*, 245, 35-42.

27.- Mata-Rocha, M., & García-López, E., & Herrera-Pérez, E. (2007). Determinación del genotipo de la apolipoproteína e (APOE) en población mexicana para su aplicación en Alzheimer tardío. *Bioquímica*, 32 (SuA), 79.

28.-Ruiz, M., Arias, I., Rolón, G., Hernández, E., Garavito, P., & Silvera-Redondo, C. (2016). Análisis del polimorfismo del gen APOE en la población de Barranquilla, Colombia. *Biomédica*, 36(1), 52-58.

Anexos

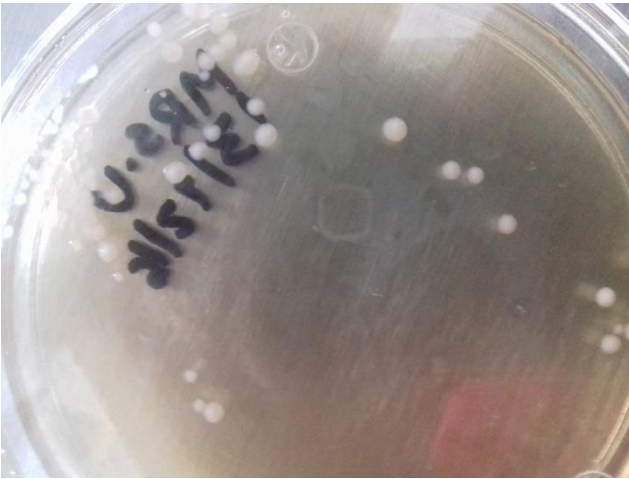
Composición del Medio MRS

Contenido	Cantidad
Peptona de proteosa No. 3	10.0 g
Extracto de res	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Dextrosa	20.0 g
Polisorbato 80	1.0 g
Citrato de amonio	2.0 g
Acetato de sodio	5.0 g
Sulfato de magnesio	0.1 g

Sulfato de manganeso	0.05 g
Fosfato dipotásico	a. g

pH de 6.5 ± 0.2

Agar MRS con vancomicina



Agar MRS con diferentes concentraciones de bilis

