

Potencial probiótico de la levadura *Cystobasidium benthicum* aislada de líquenes de Baja California Sur, México

Carlos Angulo, Miriam Angulo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR),
Grupo de Inmunología y Vacunología. eangulo@cibnor.mx

Biotecnología y Ciencias Agropecuarias

Abstract

Scientific studies indicate that the yeast (*Cystobasidium benthicum* LR192) isolated from lichens of the Sierra de San Francisco, B.C.S. México, could have probiotic potential. The objective was to evaluate the probiotic effect of the yeast in mice. A yeast culture was performed and assessed if it could adhere to the intestinal fragments of the mouse, as well as its capacity to survive gastrointestinal tract conditions. After that, the oral route was administered to mice to measure immune system activation and expression of defense-related genes. Mice receiving yeast increased toxic nitric oxide production, antibodies, and the interleukin (IL) 1 beta gene expression before an infection. Also, poisonous oxygen production and the expression of IL-6 increased upon an infection. In conclusion, the yeast isolated from lichens of Mexico showed probiotic properties for mice.

Keywords: probiotics, health, natural resources.

Resumen

Estudios científicos indican que la levadura (*Cystobasidium benthicum* LR192) aislada de líquenes de la Sierra de San Francisco, B.C.S. México, podría tener potencial como probiótico. El objetivo fue evaluar el efecto probiótico de la levadura en ratones. Se realizó un cultivo de la levadura y se valoró si podía adherirse a fragmentos de intestino de ratón; así como su capacidad para sobrevivir a condiciones del tracto gastrointestinal. Después se suministró a los ratones vía oral para medir la activación del sistema inmune y la expresión de los genes de defensa. Los ratones que recibieron la levadura incrementaron la producción de nitrógeno tóxico, anticuerpos y la expresión del gen interleucina (IL)-1 beta antes de una infección. Además, aumentaron la producción de oxígeno tóxico y la expresión del gen IL-6 después de una infección. En conclusión, la levadura aislada de líquenes de México mostró propiedades probióticas en ratones.

Palabras clave: probióticos, salud, recursos naturales.

Problemática

La necesidad de conocer los recursos naturales y sus propiedades probióticas, como el caso específico de la levadura *Cystobasidium benthicum* aislada de líquenes en Baja California Sur.

Usuarios

Productores, Ingenieros en producción animal y Médicos Veterinarios, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)..

Introducción

Los probióticos son microorganismos que al ser consumidos producen beneficios a la salud. Las bacterias, como las usadas para hacer yogurt, y las levaduras para hacer pan y vino, han sido utilizadas como probióticos. De hecho, los probióticos aumentan la capacidad de las defensas del cuerpo para prevenir y controlar enfermedades infecciosas, por ello en las evaluaciones de probióticos se determinan parámetros de la respuesta inmune. Estudios recientes demuestran que algunos probióticos habitan ambientes extremos (Patel et al., 2022), incluyendo a los asociados a líquenes (Zuñiga-González et al., 2021). Con eso en mente, la levadura *Cystobasidium benthicum* LR192 fue aislada, durante el verano, a más de 45 °C de temperatura, de líquenes crustosos (pegados a piedras) asociados a las paredes en la Sierra de San Francisco, Baja

California Sur, México; en este estudio se probó la capacidad probiótica de la levadura en ratones como un modelo para humanos (Angulo et al., 2022) con la intención de saber si podría ayudar a prevenir o controlar infecciones.

Objetivos

El objetivo fue evaluar el efecto probiótico de la levadura *Cystobasidium benthicum* LR192 en ratones.

Materiales y Métodos

La levadura se cultivó en un medio nutritivo líquido (YM a pH 5), a 30 °C, con agitación (120 r.p.m.) durante 48 h. Se realizó otro cultivo en YM modificado con la adición de bilis de pollos sanos al 1% y ácido clorhídrico hasta llegar a pH 2 y 3 para simular las condiciones del tracto digestivo. Así mismo, la levadura se colocó *in vitro* en el interior de una parte de yeyuno de ratón para evaluar su capacidad de adherencia, mediante observación con un microscopio, detectando la levadura marcada con un componente que hace que sea fluorescente (Angulo et al., 2020).

La levadura se administró a un grupo de 10 ratones, todos los días, con una dosis común (1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias, UFC), vía oral, usando suero salino como vehículo; y en otro grupo de 10 ratones sólo se administró el suero salino. Después de 10 y 15 días, los ratones fueron eutanasiados (sacrificio de los ratones) y los bazo y la sangre colectados. De los bazo se obtuvieron los esplenocitos (células del sistema inmune y estructurales) (1×10^6 células por mililitro) y para saber si la administración de la levadura aumentaba la resistencia a una infección se pusieron en contacto (incubación por 18 horas) con la bacteria patógena *Escherichia coli* 23, a una dosis de 1×10^8 UFC por mililitro. Finalmente, la respuesta de defensa (inmune) de los ratones se determinó antes y después del reto infeccioso cuantificando las actividades de la enzima mieloperoxidasa, explosión respiratoria, la fagocitosis; la producción de óxido nítrico y anticuerpos producidos por los esplenocitos (Kemenade et al., 1994; Neumann et al., 1995). También fue analizada la expresión de los genes IL-1 beta e IL-6 relacionados con la respuesta inmune de los ratones (Livak y Schmittgen, 2001).

Resultados y Discusión

La bilis al 1% y el medio ácido (pH 2 y 3) redujeron ligeramente el crecimiento de la levadura (Fig. 1). Interesantemente, la bilis está a una concentración de hasta 2% y el pH tiene un valor desde 2 en el estómago y hasta 7 en el yeyuno. Además, la levadura se adhirió al intestino de ratones, aunque falta saber cuánto tiempo duró la adhesión. La infección de las células del bazo redujo la viabilidad (supervivencia) celular e incrementó la actividad de fagocitosis (la capacidad de las células para comerse los patógenos y destruirlos). La actividad de explosión respiratoria (al día 10), es decir, la producción de moléculas de oxígeno tóxicas para destruir a los patógenos, aumentó después de la infección (Fig. 2). También, la producción de óxido nítrico (nitrógeno tóxico para los patógenos) aumentó, pero sólo antes de la infección (Fig. 2). Todo lo anterior, comparado siempre con los ratones del grupo control que no recibieron la levadura. En otros estudios existen evidencias que las levaduras probióticas pueden inducir la explosión respiratoria o la producción de óxido nítrico, o ambas, para eliminar

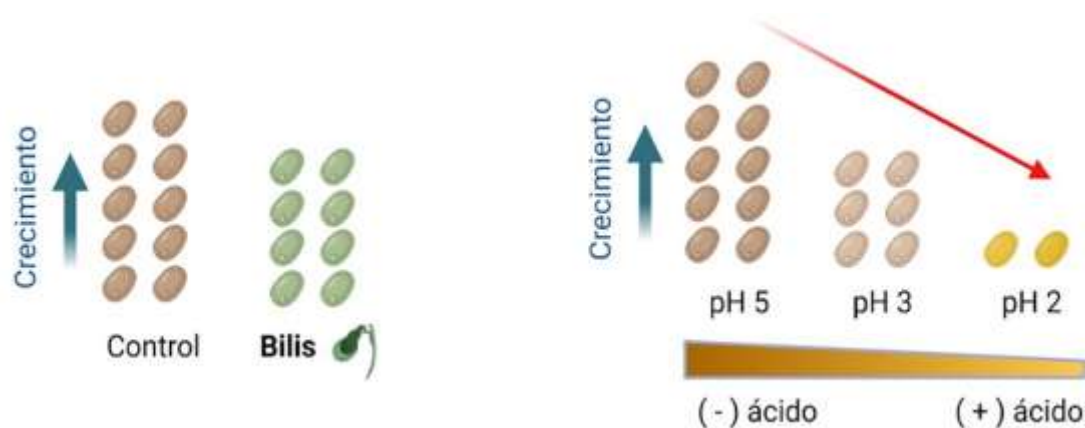
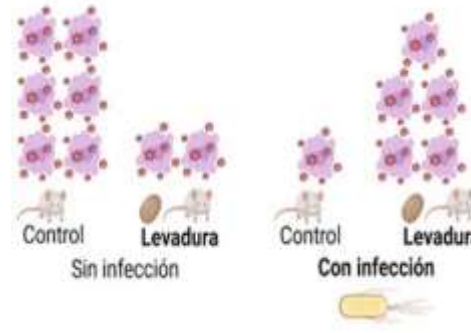


Figura 1. La presencia de bilis y medio ácido disminuyó el crecimiento de la levadura ligera a moderadamente.

Producción de oxígeno tóxico para patógenos



Producción de nitrógeno tóxico para patógenos

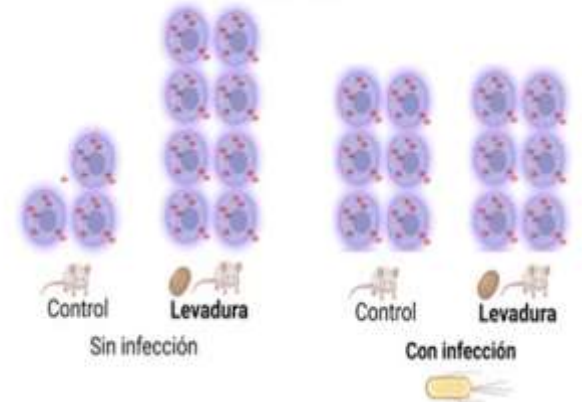
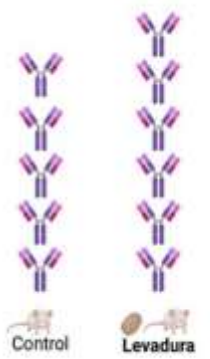
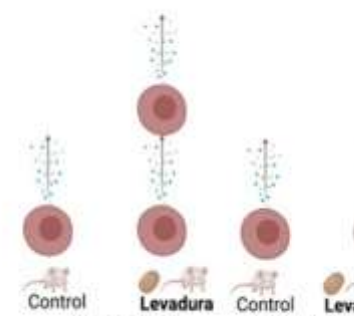


Figura 2. La producción de oxígeno tóxico y nitrógeno tóxico para patógenos fue mayor a los 10 días en los ratones que recibieron la levadura.

Producción de anticuerpos



Producción de interleucina 1 beta



Producción de interleucina 6

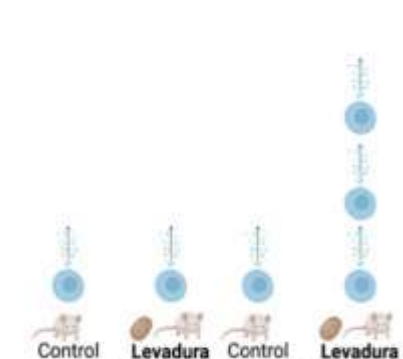


Figura 3. La producción de anticuerpos (día 10) y dos proinflamatorios: interleucina 1 beta (día 15) e interleucina 6 (día 15) fue mayor en los ratones que recibieron la levadura.

patógenos (Angulo et al. 2020). Curiosamente, la actividad de la mieloperoxidasa aumentó a los 15 días después de la infección, lo que sugiere un cambio de mecanismo de defensa en los ratones a ese tiempo. Los anticuerpos en sangre aumentaron también, pero hasta los 10 días de administración de la levadura (Fig. 3). Finalmente, algunos genes del sistema de inmune de los ratones aumentaron su expresión. Por ejemplo, interleucina 1 beta (un potente proinflamatorio) aumentó antes de la infección, mientras que interleucina 6 (otro fuerte proinflamatorio) lo hizo después de la infección (Fig. 3). Llama la atención que el gen de interferón gamma tuvo una expresión reducida en los ratones suplementados con la levadura, antes y después de la infección. Estos resultados confirman lo reportado en otros estudios en los que se ha demostrado que las levaduras probióticas pueden aumentar o suprimir genes para regular la respuesta inmune antes, durante y después de una infección (Angulo et al., 2020). En México, existen alrededor de 2500 especies de líquenes registradas, lo que resalta la importancia de su conservación y aprovechamiento para generar un beneficio a la salud. Por otra parte,

se ha demostrado que diferentes cepas de *C. benthicum* (o sus moléculas) aisladas de diversos lugares han activado la respuesta inmune en especies animales (Wang et al. 2015; Reyes-Becerril et al. 2021).

Conclusiones

La levadura *Cystobasidium benthicum* LR192 mostró propiedades probióticas con capacidad para regular el sistema inmune de ratones. Sin embargo, algunos resultados obtenidos dejan aún dudas sobre su potencial uso como probiótico en humanos. Por ello, los estudios siguientes en ratones deben incluir la administración de diferentes dosis, frecuencias y retos infecciosos con otros patógenos para considerar su posible estudio en humanos.

Impacto Socioeconómico

El impacto socioeconómico de los líquenes radica, entre otros, en su uso en la medicina tradicional. Además, los líquenes y los microorganismos asociados son utilizados por la industria para obtener productos biofarmacéuticos. En este trabajo también se demuestra que los líquenes son fuente natural de posibles probióticos que pueden ayudar a incrementar la resistencia de infecciones. Por ello, el cultivo de líquenes en laboratorio o en campo debería ser un esfuerzo científico para conservar y aprovechar sustentablemente este recurso natural.