



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

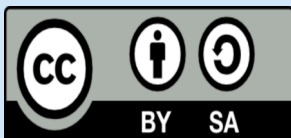
Oyenes, Florencia Belén

Fermentación de betaglucanos por la microbiota intestinal : Modificación de poblaciones bacterianas, producción de ácidos grasos de cadena corta y actividad inmunomodulatoria in vitro

Instituto de Ciencias de la Salud

2025

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – Compartir igual 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Oyenes, F. B. (2025). Fermentación de betaglucanos por la microbiota intestinal : Modificación de poblaciones bacterianas, producción de ácidos grasos de cadena corta y actividad inmunomodulatoria in vitro [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3297>

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Licenciatura en Bioquímica

Trabajo final:

“FERMENTACIÓN DE BETAGLUCANOS POR LA MICROBIOTA INTESTINAL: MODIFICACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS, PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y ACTIVIDAD INMUNOMODULATORIA *in vitro*”.

Alumna: Oyenes, Florencia Belén

Directora: Dra. Medrano, Micaela

Co- directora: Dra. Serradell, María de los Ángeles

Tutor: Simonelli, Nicolás



INDICE

RESUMEN.....	4
MARCO TEORICO	5
Prebióticos, microbiota intestinal, eubiosis y disbiosis	5
Composición de la microbiota intestinal en adultos	5
Productos de fermentación bacteriana en el colon	6
β- glucanos	8
Butirato.....	8
Butirato y sistema inmune	9
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y METODOS	12
A. Muestras de materia fecal	12
B. Composición inicial de la microbiota bacteriana intestinal	12
C. Fermentación <i>in vitro</i> de β-glucanos por la microbiota intestinal.....	13
D. Evaluación de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta.....	14
E. Evaluación del efecto de los ácidos grasos de cadena corta en un modelo <i>in vitro</i> de inmunomodulación.....	15
F. ANALISIS ESTADISTICO	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
A. Composición inicial de la muestra fecal inicial.....	18
B. Modificación del perfil bacteriano luego de la fermentación <i>in vitro</i>	22
C. Evaluación de la producción de ácidos grasos de cadena corta.....	25
D. Relación entre la producción de ácidos y abundancias de los grupos taxonómicos.....	28
E. Evaluación del efecto de los ácidos en la respuesta inmune	31
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a mi querida Universidad Nacional Arturo Jauretche, por brindarme la oportunidad de formarme como profesional y como persona. En este establecimiento, no solo he encontrado una excelente formación académica, gracias a sus grandes docentes, empleados y compañeros, sino también una rica formación en valores y un ambiente de amor y respeto.

La niña de 16 años que soñaba con obtener un título universitario, hoy ha logrado alcanzar su meta, y este logro es un orgullo no solo para mí, sino también para esta gran institución que elegí para hacerlo realidad.

En segundo lugar, quiero agradecer a mi familia, mi gran sostén y razón de ser. Los amo. Mamá y papá, esto es para ustedes, mi gran orgullo es saber que están orgullosos de mí y sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Nicolás, Lautaro y Valentina, mis tres tesoros, gracias por llenar mis días grises de amor y alegría, quiero verlos triunfar siempre. También quiero agradecer a mis padrinos, Mirta y Eduardo, y mis primos, Zoe e Ignacio, gracias por ser mi segundo hogar y por todo lo que hacen por mí.

En tercer lugar, a mis amigas, gracias por creer en mí y por su amor sin límites. No voy a nombrarlas a todas pero ustedes saben muy bien quienes son y que las amo. Sin embargo hay alguien especial que quiero mencionar, mi hermana del alma Rocio. Gracias por estar siempre y celebrar mis logros como propios. Te amo por ser incondicional y por hacer que tu familia sea mi familia también.

En cuarto lugar, quiero agradecer a todos aquellos profesores que dejaron una marca en mi corazón y moldearon mi formación como profesional. Entre ellos, hay tres personas que destacan especialmente:

Micaela Medrano, gracias por creer en mí desde el principio y por ofrecerte a ser mi directora. Me brindaste la oportunidad de desarrollar un trabajo final que me llena de orgullo y me acompañaste en cada paso del camino con dedicación y amor, inculcándome entusiasmo y dedicación.

María de los Ángeles Serradell, agradezco enormemente que te hayas unido a este proyecto y hayas compartido tus conocimientos con nosotras. Tu pasión y expertise me han inspirado siempre y me han hecho descubrir lo mucho que me gusta esta fascinante área.

Ana María Togneri, aunque no formas parte de este equipo, tu influencia en mi elección ha sido muy importante. Gracias por enseñarme a amar el mundo de los microorganismos y por ser una docente apasionada y comprometida.

A las tres, las admiro y agradezco su determinación, amor y compromiso con la docencia. Han dejado una huella imborrable en mi corazón y en mi formación como profesional.

Por último, agradecer a todas las personas que formaron parte de este camino, con su aporte o enseñanza. Sobre todo a aquella que apareció este último tiempo y me hizo ponerme a escribir cuando tenía tantos miedos y no me creía posible, te quiero.

"El éxito no es el final, el fracaso no es fatal: es el valor para seguir adelante lo que cuenta". (Winston Churchill)

Quiero terminar con esta cita, que resume perfectamente mi experiencia en esta Universidad. Ha sido un camino lleno de desafíos, pero también de logros y aprendizajes. Estoy agradecida por cada momento y por cada persona que ha sido parte de este proceso. Sueñen grande y trabajen duro, que todo llega en la vida.

RESUMEN

En este trabajo de investigación se evaluó *in vitro* la fermentación de β -glucanos por parte de bacterias intestinales. Para esto, en primer lugar, se analizó la composición de la microbiota intestinal presente en materia fecal de origen humano de cuatro (4) donantes sanos y de un *pool* conformado por las 4 muestras de los mismos (tiempo cero). Posteriormente, se realizaron los ensayos de fermentación *in vitro*, usando el *pool* de barros fecales para inocular medios de cultivo conteniendo diferentes carbohidratos (medio con β -glucanos, celobiosa e inulina y medio sin hidratos de carbono) a diferentes tiempos de incubación (24 y 48 h). Se evaluó la composición de la microbiota en los medios fermentados. El estudio de la composición de la microbiota de los medios fermentados así como del inóculo inicial (*pool* y muestras individuales) se realizó por amplificación de regiones hipervariables del gen que codifica para el ARNr 16S y secuenciación masiva de los amplicones. Los resultados obtenidos mostraron que inicialmente tanto en el *pool* como en las muestras individuales de materia fecal, el *Phylum* con mayor abundancia relativa fue *Firmicutes*, seguido por *Bacteroidota* y *Proteobacteria*, excepto en uno de los donantes donde se encontró como segundo *Phylum* en abundancia a *Verrumicrobiota*. Luego de la fermentación *in vitro* en las diferentes condiciones experimentales (medio con β -glucanos, glucosa, celobiosa y medio sin hidratos de carbono) este comportamiento se siguió manteniendo. Sin embargo, el *Phylum Firmicutes* incrementó su abundancia relativa en un 20% en el medio conteniendo β -glucanos en comparación con el medio sin hidratos de carbono, así como en comparación con el medio con glucosa.

En los mismos ensayos de fermentación *in vitro* se evaluó además la producción de ácidos grasos de cadena corta: ácidos acético, propiónico y butírico. Los resultados de dichos experimentos mostraron que la producción de los tres ácidos estudiados (acético, propiónico y butírico), se incrementó en comparación con los valores presentes en el *pool* de materia fecal al tiempo cero, viéndose una mayor producción a las 48 h que a las 24 h. En el caso particular del medio con β -glucanos, se encontraron los tres ácidos evaluados con valores significativamente mayores al medio control sin carbohidratos.

Al relacionar los resultados de la secuenciación de las poblaciones bacterianas y la producción de ácidos de cadena corta en la fermentación *in vitro*, concluimos que las poblaciones de bacterias típicamente productoras de butirato no fueron estimuladas en el medio conteniendo los β -glucanos. La secuenciación de poblaciones bacterianas reveló que la Familia *Selenomonadaceae* fue la más abundante en el medio con β -glucanos. Si bien esta familia no se relaciona directamente con la producción de butirato, algunos autores encontraron que ciertas cepas de esta familia pueden producir butirato a través de vías metabólicas no típicas. Por otro lado, la Familia *Prevotellaceae*, que incluye bacterias productoras de butirato, se expresó más en presencia de celobiosa que en presencia de β -glucanos. Esto podría explicar el aumento en la producción de butirato en la condición con celobiosa.

Finalmente, se evaluó la modulación de la respuesta inmune *in vitro* por parte de los diferentes ácidos estudiados. Para ello, se utilizó un modelo con células de la línea Caco-2/TC-7, que fueron tratadas con flagelina como estímulo proinflamatorio, y se analizó la expresión de la quimoquina CCL20 mediante qPCR. Los resultados de esta prueba demostraron que tanto el ácido acético como el propiónico tienen un efecto inmunomodulador sobre la expresión de dicho mediador inmunológico.

MARCO TEORICO

Prebióticos, microbiota intestinal, eubiosis y disbiosis

Los prebióticos son compuestos (mayoritariamente oligos y polisacáridos) no digeribles capaces de “estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales que favorecen la salud” (Gibson *et al.*, 2017). La evidencia científica que relaciona su consumo con el favorecimiento de poblaciones bacterianas benéficas, la producción de metabolitos bioactivos y la disminución de la incidencia de patologías intestinales -entre otros beneficios- crece exponencialmente (Sanders *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2022). Los prebióticos se pueden considerar alimentos funcionales capaces de otorgar un beneficio en la salud del consumidor, y se encuentran regulados por el Código Alimentario Argentino (Capítulo XVII, Art 1390 - Res. Conj. SPReI 229/2011 y SAGyP 731/2011).

La microbiota intestinal se refiere al conjunto de microorganismos que colonizan mayormente el intestino grueso en una relación recíprocamente benéfica. La microbiota se va adquiriendo a lo largo de la vida, y está fuertemente influenciada por los diferentes eventos en el desarrollo de un individuo, como: la etapa intra-uterina, el modo de nacimiento y el tipo de lactancia, así como los tratamientos con antibióticos (Ottman *et al.*, 2012; Collado *et al.*, 2016; Zimmermann & Curtis, 2019). Luego, la microbiota se va complejizando con la incorporación de alimentos en la dieta, y ya en el adulto está fuertemente influenciada por los hábitos de vida y sobre todo por el tipo de alimentación (Conrad & Vlassov, 2015; Zmora *et al.*, 2019). De este modo, la microbiota intestinal compone un ecosistema único que no se repite entre individuos de la misma especie (lebba *et al.*, 2016).

El estado de equilibrio del ecosistema microbiano intestinal con el hospedador se denomina *eubiosis*, mientras que se denomina *disbiosis* al estado alterado de este equilibrio (lebba *et al.*, 2016). Una microbiota intestinal en estado de *eubiosis* se caracteriza por una preponderancia de especies, pertenecientes principalmente a los *Phyla Firmicutes* y *Bacteroidota* que representan juntos más del 70 % de la población bacteriana, mientras que *Phyla Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrumicrobiota* y *Fusobacteria* están presentes, pero en menor proporción. El estado de desequilibrio (*disbiosis*) ha sido correlacionado con gran cantidad de afecciones y patologías intestinales (colon irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cáncer de colon, entre otras) (Conrad & Vlassov, 2015; Gao *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018), y no intestinales (enfermedades autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, autismo, enfermedad cardiovascular, alergias, síndrome metabólico, diabetes y obesidad), a través del eje intestino-cerebro gracias a su conexión vía nervio vago (Mayer *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2021). Estas patologías son usualmente complejas y de causas multifactoriales, y muchas veces están relacionadas con las consecuencias del uso prolongado de antibióticos, que desestabilizan el equilibrio del ecosistema intestinal (lebba *et al.*, 2016).

Composición de la microbiota intestinal en adultos

La mayoría de los estudios sobre la microbiota realizados hasta la fecha se han centrado en la microbiota del tracto gastrointestinal de los adultos, que comprende principalmente los *Phyla Firmicutes*, *Bacteroidota* y *Proteobacteria* (Huttenhower *et al.*, 2012). La proporción de cada *Phylum* varía según la ubicación geográfica (Schnorr *et al.*, 2014). Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que *Firmicutes* tienen una mayor abundancia relativa en adultos en países no industrializados (Schnorr *et al.*, 2014;

Martínez et al., 2015), mientras que la microbiota intestinal de los adultos en sociedades occidentalizadas parece exhibir una proporción más alta de *Bacteroidota* que de *Firmicutes* (*Huttenhower et al., 2012; Zhu et al., 2015*).

Una mayor proporción de *Firmicutes* que de *Bacteroidota* se ha atribuido principalmente a la obtención de energía (kcal) a partir de productos de fermentación bacteriana y al aumento de peso corporal (*Turnbaugh et al., 2006*). Se requieren más trabajos futuros para comprender la relación entre los niveles relativos de *Firmicutes* y *Bacteroidota* y sus funcionalidades asociadas en poblaciones humanas sanas en diferentes geografías y su posible impacto en la salud y la obesidad.

En general, la microbiota del tracto gastrointestinal permanece relativamente estable durante la edad adulta, excepto después de perturbaciones como infecciones, tratamiento con antibióticos o intervenciones dietéticas drásticas (*David et al., 2014*). Aunque la microbiota del tracto gastrointestinal se recupera a su estado inicial con relativa rapidez (*Wu et al., 2011; David et al., 2014*), estas perturbaciones alteran sutilmente la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal con el tiempo y probablemente sean importantes impulsores de las amplias diferencias interindividuales que son evidentes en adultos sanos (*Zhu et al., 2015*). En conjunto, esto sugiere que el hologenoma humano [el conjunto de genomas humanos y microbianos (*Moran & Sloan, 2015*)] es muy específico de cada individuo.

Productos de fermentación bacteriana en el colon

Los macronutrientes (lípidos, hidratos de carbono y proteínas) no digeridos y fibras dietarias que alcanzan el colon, se someten a fermentación bacteriana, lo que resulta en la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés *short chain fatty acids*).

La microbiota comensal también tiene un efecto trófico, regulando la proliferación de las células epiteliales y el mantenimiento de las uniones intercelulares estrechas y, de este modo, contribuye a fortalecer la función del epitelio como barrera física frente a la entrada de agentes exógenos (*Soderholm & Pedicord, 2019*). Este efecto es ejercido a través de la producción de los SCFA. Estos contienen de 2 a 6 átomos de carbono, y son ejemplo de ellos: el ácido acético, propiónico y butírico, o acetato, butirato y propionato (en sus formas no protonadas); los SCFA se forman a partir de la fermentación de carbohidratos complejos por parte de las bacterias del colon (*Zhang et al., 2015*).

Estos SCFA son utilizados por el epitelio intestinal como sustrato energético para mantener su integridad y función. Destacando en este sentido el ácido butírico, por ser el principal metabolito energético utilizado por los colonocitos (*Manrique & González Sánchez, 2017*). La mayoría de los SCFA (hasta el 95 %) son absorbidos rápidamente por los colonocitos, lo que resulta en una disminución de las concentraciones desde el colon proximal hasta el distal. En general, los ácidos grasos de cadena corta mantienen una proporción 2:1:1 (acético: propiónico: butírico), y si los valores se encuentran dentro de parámetros normales, se consideran indicadores de buena salud intestinal (*Topping & Clifton, 2001*).

Aunque el colon es el principal lugar de esta fermentación, la microbiota de otros sitios, como el intestino delgado (donde se encuentran principalmente lactobacilos y estreptococos), contribuye al metabolismo de macronutrientes provenientes de la alimentación (Mowat *et al.*, 2014; Hosseinkhani *et al.*, 2021).

En la **figura 1** se muestran las vías metabólicas que generan estos ácidos a partir de la fermentación de hidratos de carbono por el conjunto de bacterias intestinales.

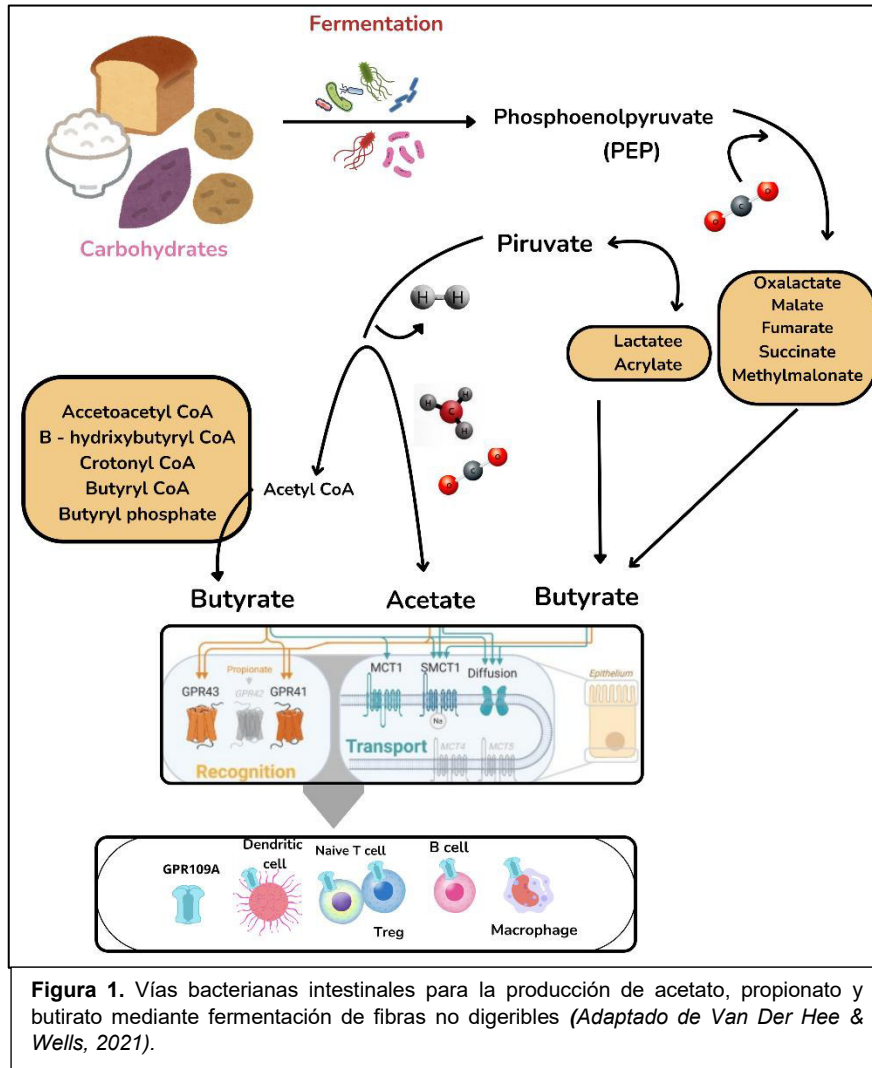


Figura 1. Vías bacterianas intestinales para la producción de acetato, propionato y butirato mediante fermentación de fibras no digeribles (Adaptado de Van Der Hee & Wells, 2021).

Los SCFA pueden modular las funciones celulares mediante la activación de receptores acoplados a proteína G sensibles a la toxina de la tos ferina (GPCR), que detectan los SCFA. Entre ellos se encuentran el GPR41 (receptor de ácidos grasos libres 3; *FFAR3*), el GPR43 (receptor de ácidos grasos libres 2; *FFAR2*) y el GPR109A (receptor de ácido hidroxicarboxílico 2; *HCAR2*). Estos receptores se expresan en varios tipos de tejidos y células en humanos y animales (Agus, *et al.*, 2016; Parada Venegas *et al.*, 2019; Tunaru *et al.*, 2003).

A través de interacciones con estos GPCR, los SCFA pueden activar cascadas de señalización antiinflamatoria y modular la homeostasis intestinal. Utilizando modelos experimentales de ratones para inducir la inflamación intestinal y la infección bacteriana, la expresión a GPR43, GPR41 y SCFA fue necesaria para generar una respuesta inmunitaria, y mitigar las agresiones inflamatorias y eliminar las bacterias, a través de la

inducción de la liberación de quimiocinas y citocinas en las células epiteliales intestinales y las células T efectoras activadas (Kim, et al., 2013). Estas respuestas se debieron a la activación de la quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares y de la proteína quinasa activada por mitógeno p38, que dependían de GPR41/43 GPR109A se expresa en gran medida en las células inmunes innatas y en el tejido adiposo, así como en la membrana apical de las células epiteliales intestinales. (Kim, et al., 2013).

β- glucanos

Los β- glucanos constituyen la pared celular de algunos hongos y de las levaduras, y son los principales polisacáridos presentes en estos organismos, además del agua (90 %), las proteínas y los aminoácidos (10-40 %), las grasas (2-8 %), las vitaminas y los antioxidantes, las sales residuales y los metales. Los carbohidratos totales, incluidos los polisacáridos, representan aproximadamente el 50 % de la materia seca de los hongos (Cerletti, et., al 2021).

Los β-glucanos de levaduras tienen una estructura molecular formada por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos de tipo β en dos posiciones diferentes, 1,3 y 1,6, siendo más frecuentes los enlaces 1,3 (alrededor del 85 %), respecto a los 1,6 (Cerletti, et., al 2021).

La actividad biológica de los β-glucanos fúngicos en general es bien reconocida y los informes científicos sobre sus propiedades beneficiosas para la salud están aumentando (Nakashima et al., 2018; Murphy et al., 2020; Cerletti et al., 2021; Thomas et al., 2022). Los β-glucanos fúngicos se consideran prebióticos que estimulan el crecimiento y la actividad de la microbiota intestinal sana, al tiempo que inhiben el crecimiento de patógenos, previniendo procesos inflamatorios, así como el cáncer de colon (Khan, et al., 2019).

Recientemente, se ha demostrado que los β-glucanos obtenidos a partir de las paredes celulares de los hongos, atraviesan el sistema digestivo sin ser hidrolizados y que pueden ser fermentados por la microbiota intestinal, favoreciendo el desarrollo de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium longum*, por lo que se consideran compuestos prebióticos comparables a la inulina y tienen el potencial de ser considerados ingredientes alimentarios funcionales (Wang et., al 2020).

Butirato

Dentro de los ácidos grasos de cadena corta producidos *in situ* en el colon por la fermentación bacteriana de las fibras, el butirato tiene especial relevancia, ya que es el principal sustrato energético de las células epiteliales del colon para la realización de todas sus funciones metabólicas, estimulando la absorción de sodio y agua. Por otro lado, interviene en el mantenimiento de las uniones estrechas, contribuyendo a la homeostasis intestinal (Duncan et al., 2004; Chen et al., 2020) y tiene la particularidad de inducir apoptosis en células tumorales (Donohoe et al., 2012). El butirato puede inhibir las histonas-desacetilasas de las células tumorales del hospedador (Jan et al., 2002).

El butirato es producido por poblaciones de microorganismos específicas, como por ejemplo representantes de la Familia *Ruminococcaceae* y del género *Roseburia* (Duncan et al., 2004; Farup et al., 2016), y por las especies *Faecalibacterium prausnitzii*

(Sokol et al., 2008) y *Clostridium butyricum* (Chen et al., 2020). Estas poblaciones se ven incrementadas en individuos que consumen dietas ricas en fibra. Al mismo tiempo, se correlacionan con la reducción de la probabilidad de padecer enfermedades inflamatorias como cáncer de colon.

Butirato y sistema inmune

Como el compartimento más grande del sistema inmunológico, el intestino contiene distinciones anatómicas y fisiológicas de sus componentes inmunológicos. Las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos comprenden tejidos linfoides organizados conocidos, como el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT, del inglés *gut-associated lymphoid tissue*). Los sitios efectores del GALT son el epitelio de la mucosa y la lámina propia subyacente. Dentro de la lámina propia hay muchas células inmunes diferentes, incluidas las células T activadas, las células plasmáticas y numerosas células inmunes innatas, incluidos los mastocitos, las células dendríticas, los eosinófilos y los macrófagos.

En la **figura 2** se observa la Interacción de la microbiota intestinal con componentes de la inmunidad innata y adaptativa intestinal.

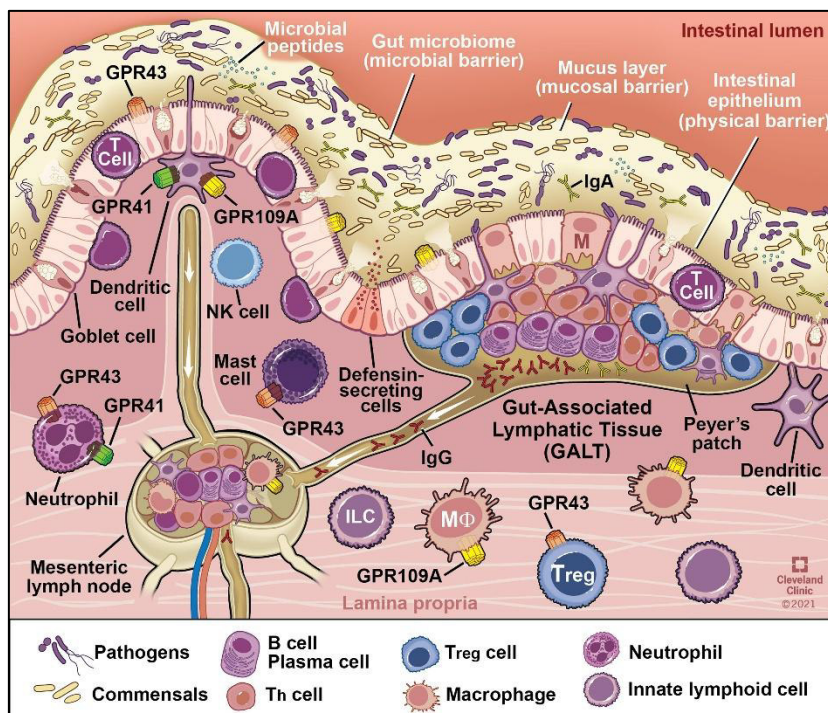


Figura 2. Interacción de la microbiota intestinal con componentes de la inmunidad innata y adaptativa intestinal. Las células inmunitarias intestinales, incluidas las células dendríticas y los mastocitos, los neutrófilos y los linfocitos B y T, se muestran en lugares representativos dentro de la mucosa gastrointestinal. Los receptores acoplados a proteína G en los que el butirato actúa como ligando están presentes en las principales células inmunitarias y funcionan como un vínculo clave para la modulación de la función inmunitaria mediada por el butirato (Extraído de Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography ©2021).

El butirato desempeña un papel crucial en la regulación de inmunidad intestinal, tanto en la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa, y su efecto inflamatorio y

antioxidante es importante para mantener la homeostasis intestinal. Por un lado, en lo que respecta a la inmunidad innata, el butirato refuerza la integridad de la barrera epitelial intestinal y previene la alteración de la función de barrera. También inhibe la inflamación en el intestino al suprimir la activación de NF- κ B y la producción de citocinas proinflamatorias. El butirato también modula las funciones de los neutrófilos, macrófagos y mastocitos, que son células inmunitarias importantes en la inmunidad innata. Además, induce la producción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales intestinales y los macrófagos. Por el otro lado, en cuanto a la inmunidad adaptativa, el butirato también juega un papel importante, específicamente en la regulación de las células T y B. El butirato puede aumentar la proliferación de células T reguladoras extratímicas y promover la producción de IL-10 por parte de las células T. Además, el butirato puede modular la expresión génica en los linfocitos T citotóxicos CD8+ y alterar la expresión génica de moléculas efectoras como IFN- γ de manera dependiente de la dosis. (Siddiqui & Cresci, et al., 2021).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la fermentación de β - glucanos obtenidos de paredes de levaduras por parte de bacterias intestinales, focalizando los estudios en la producción de ácidos orgánicos de cadena corta y el efecto de estos en la modulación de la respuesta inmune en modelo *in vitro*.

Para cumplir el objetivo general, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- a- Evaluar la composición inicial de la microbiota intestinal de diferentes donantes sin patologías mediante secuenciación masiva.
- b- Evaluar *in vitro* las modificaciones en las poblaciones bacterianas dadas por la fermentación de los β - glucanos y la producción de metabolitos con actividad biológica (ácidos grasos de cadena corta).
- c- Evaluar el efecto de los ácidos orgánicos producidos en un modelo de inmunomodulación *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

A. Muestras de materia fecal

Se trabajó con 4 muestras de materia fecal provenientes de 4 donantes sin patologías intestinales pertenecientes a personas de un grupo etario comprendido entre 25 a 55 años. Se puso como requisito que las personas tuviesen una dieta omnívora y que no hayan consumido antibióticos en seis meses previos a la donación de la muestra.

Las muestras de materia fecal fueron recolectadas y entregadas por los donantes en envases estériles, dentro de las 4 h después de la deposición, junto a una nota de consentimiento informado. El protocolo de trabajo fue avalado por el comité de Bioética del Hospital El Cruce (Aval D00109/2023, fecha: 25/07/23). Una vez recibidas, las muestras de materia fecal fueron conservadas en refrigeración y en condiciones de anaerobiosis hasta el momento de su procesamiento.

B. Composición inicial de la microbiota bacteriana intestinal

Las poblaciones microbianas presentes en la materia fecal de los donantes fueron identificadas y cuantificadas mediante secuenciación masiva de nueva generación (*Next Generation Sequencing*). A tal efecto, el DNA bacteriano total se extrajo y purificó mediante un kit específico para extracción de ADN de materia fecal (TIANGEN TIANamp Stool DNA Kit China) siguiendo las indicaciones del fabricante. Utilizando un espectrofotómetro Nano-drop (Thermo Scientific) se evaluó la pureza y la calidad del DNA extraído. Mediante el uso de un Fluorómetro Quibit 4 (Illumina) se cuantificó el DNA de doble cadena (necesario para las etapas siguientes de amplificación).

Se amplificó la región V4 del ADN codificante para la región 16S rRNA utilizando los siguientes primers:

forward, 5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3';

reverse, 5'-

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'.

Se preparó una biblioteca de ADN usando un kit Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, San Diego, California, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La secuenciación masiva de los amplicones 16S rRNA se realizó utilizando un sistema de secuenciación iSeq100 (Illumina) y un kit iSeq100 v2 Reagent Kit (Illumina San Diego, California, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Estas determinaciones fueron realizadas en la Escuela de Deportes de la Universidad de Waseda (Japón) generando lecturas de una longitud de 2 x 300 pb.

Se utilizó el complemento (*plugin*) DADA2 (*Callahan et al., 2016*) en QIIME2 para el filtrado de calidad, la eliminación de ruido, la eliminación de quimeras y la inferencia de

variantes de secuencia de amplicón (ASV, por sus siglas en inglés). La asignación taxonómica de las ASV se realizó utilizando un clasificador de taxonomía contra la base de datos SILVA 16S (versión 138). Todas las muestras se redujeron a 10,000 lecturas antes de los análisis de diversidad.

C. Fermentación *in vitro* de β -glucanos por la microbiota intestinal

Se preparó medio de cultivo base según *Al Tamimi et al., 2006. (Tabla 1)*

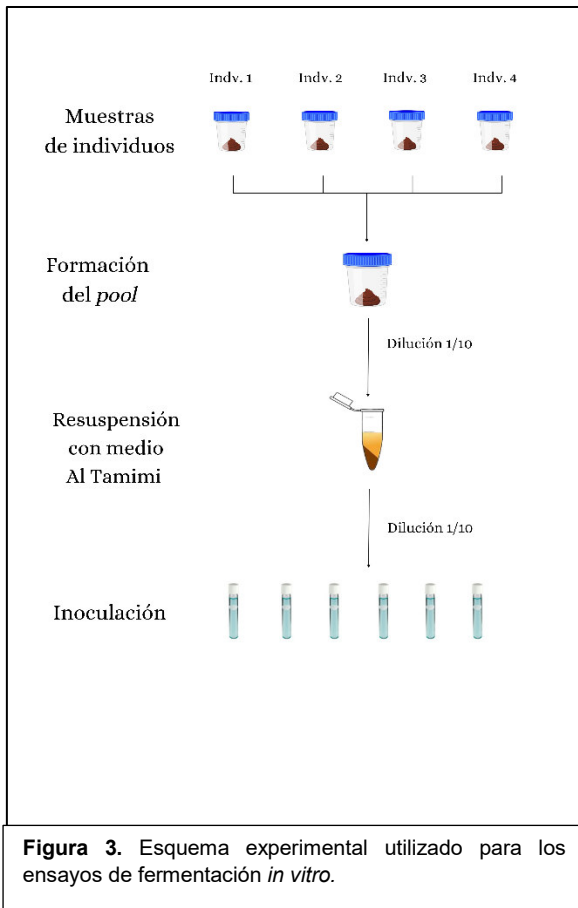
TABLA 1: Composición del medio formulado por Al-Tamimi *et al.* (2006).

COMPONENTE	CANTIDAD (GR) c.s.p 1000 mL
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.04 g
MgSO ₄	0.01 g
CaCl ₂ . 6 H ₂ O	0.01 g
NaHCO ₃	2 g
Sales biliares	0.5 g

El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, luego se adicionaron en esterilidad: 1 ml/L de solución de hemina (ICN) al 0,5 % p/v, 10 µg/ml de solución de vitamina K comercial (Roche) al 0,1 % p/v y 0,5 g/L de cisteína acidulada con HCl (Anedra). El pH se llevó a 7,5.

A partir del medio base se prepararon otros medios a los cuales se le adicionaron diferentes hidratos de carbono alcanzando una concentración final de 2 g/L: β -glucanos provenientes de paredes de levaduras cerveceras (obtenidos en TIF previo) (*Reymar 2023*), celobiosa (Sigma Aldirich) e inulina comercial (Saporitti). Además, se incluyeron controles con glucosa y sin azúcares. Los medios se fraccionaron en tubos hach estériles (10 ml/tubo).

Como inóculo para los medios se preparó un *pool* de materia fecal. Para ello, se mezclaron en partes iguales las muestras de materia fecal de los 4 individuos, y se resuspendieron en una proporción 1/10 en el medio de cultivo base. Con dicha suspensión, se inocularon los tubos hach en una proporción 1/10 (**Figura 3**).



Las fermentaciones se realizaron por triplicado y los tubos se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 48 h, utilizando una jarra de anaerobiosis Anaerojar (Oxoid) y un kit para generación de atmosfera anaeróbica (Mitsubishi).

Una vez transcurridas las 48 h, los medios fermentados se centrifugaron (3600 xg, 10 minutos). Los pellets fueron reservados para estudiar las poblaciones bacterianas que resultaron estimuladas luego de la fermentación, mediante NGS (metodología descrita en el ítem b).

Los sobrenadantes fueron filtrados utilizando membranas de 45 micras de diámetro de poro (Millipore), y se reservaron para identificar y cuantificar los ácidos orgánicos producidos por la microbiota intestinal en cada condición.

D. Evaluación de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta

Se evaluó la producción de ácidos orgánicos de cadena corta (SCFA) mediante cromatografía gaseosa (CG).

Para la identificación y cuantificación de ácidos orgánicos, se utilizó un cromatógrafo gaseoso (Agilent Technologies, Modelo 7890A, USA) equipado con una columna DBFATWAX UI de 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm. Las condiciones operativas del cromatógrafo fueron:

- Inlet: 280 °C

- Relación de división (Split): 50:1
- Flujo: 1 mL/min
- Programa de temperatura: rampa de 120 °C, manteniendo durante 2 minutos, luego aumentando 5 °C/min hasta alcanzar 140 °C.

Se utilizaron curvas de calibración que contenían seis ácidos orgánicos (ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico) en concentraciones de 0, 5, 7.5 y 10 mM (Sigma Aldrich, USA).

E. Evaluación del efecto de los ácidos grasos de cadena corta en un modelo *in vitro* de inmunomodulación.

Se analizó el efecto inmunomodulador de los metabolitos presentes en los sobrenadantes obtenidos a partir de la fermentación de los β -glucanos sobre células epiteliales intestinales de origen humano (línea celular Caco-2/TC-7). Para ello se prepararon soluciones a partir de patrones comerciales de cada ácido alcanzando la concentración final que se cuantificó mediante CG en los sobrenadantes de fermentación luego de 48 h (punto c). Las concentraciones finales que se alcanzaron fueron 24 mM de ácido acético, 11 mM de ácido propiónico y 9 mM de ácido butírico. Las soluciones obtenidas fueron neutralizadas, en caso de ser necesario.

Las células se cultivaron en medio DMEM (Gibco, USA) suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (Internegocios S.A., Argentina), aminoácidos no esenciales (Gibco, USA) y penicilina (12 UI/ml) /estreptomomicina (12 mg/ml), en estufa gaseada con 5% de CO₂, a 37°C. Las células se incubaron con los ácidos grasos de cadena corta, en presencia o no de flagelina de *Salmonella enterica* serovar. *Typhimurium* (1 μ g/ml) como estímulo proinflamatorio, durante 4 h.

Luego, las células se cosecharon con tripsina, se lisaron y se extrajo el ARN empleando "Bio-Zol I, RNA Extraction" (PB-L, Argentina), siguiendo el siguiente protocolo de trabajo:

1. Homogenización: Se lisaron directamente las células añadiendo 1 ml de Bio-Zol en una placa de cultivo (1 ml cada 10 cm²), pipeteando varias veces el lisado celular.

2. Separación de fases: Se incubó la muestra homogenizada por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se añadió 0,2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Bio-Zol. Se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Se centrifugaron las muestras a 12,000xg durante 10 minutos a 4°C. Luego de centrifugar la muestra se tomó la fase superior en donde se encuentra el ARN.

3. Precipitación del ARN: Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se precipitó el ARN de la fase acuosa mezclándolo con 0,5 ml alcohol isopropílico por cada 1 ml de Bio-Zol usados en la homogenización inicial. Se incubó por 20 minutos a -20°C y luego se centrifugó a 12,000xg durante 10 minutos a 4°C.

4. Lavado del ARN: Se removió el sobrenadante. Se lavó el pellet de RNA con 1 ml de etanol a 75% por cada 1 ml de Bio-Zol. Se mezcló la muestra en vórtex y se centrifugó a 12,000xg durante 5 minutos a 4°C.

5. Resuspensión del RNA: Se secó brevemente el pellet de ARN (al aire por 5 minutos), teniendo cuidado de que no se seque completamente ya que esto provoca la disminución de la solubilidad. Se disolvieron las muestras de RNA en 25 µl de agua libre de RNAsa. Se conservaron las muestras a – 80°C.

Una vez realizada la extracción, las muestras de RNA se cuantificaron mediante espectrofotometría UV (NanoDrop 2000) y con las muestras de ARN purificado se realizó una transcripción reversa empleando M – MLV Transcriptasa (PB-L, Argentina), siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor:

1. Mezcla de reacción (correspondiente a 20 µl que se utilizan para retrotranscribir de 1 a 5 µg de RNA total o 500 ng de ARNm):

En un tubo de reacción libre de nucleasas se añadió: 2 µl de hexámeros al azar, 2 µl de dNTPs, 50-500 ng de ARNm y agua libre de nucleasas para completar un volumen de 15 µl. Luego se calentó a 70 °C durante 5 minutos (este paso permite la relajación de la estructura secundaria del ARN) e inmediatamente se colocó en un tubo con hielo por 2 minutos. Se centrifugó brevemente y luego se añadió 4 µl de buffer de reacción 5x. Se añadió 1 µl (200U) de *M-MLV Transcriptasa* (PB-L, Argentina) y se mezcló suavemente.

2. Síntesis de cDNA por retrotranscripción: se siguió el siguiente protocolo:

Temperatura	Tiempo
25 °C	10 minutos
37 °C	50 minutos
95 ° C	5 minutos

Nota: Volumen final de trabajo 20µl

A continuación, se determinó el nivel de expresión del mediador proinflamatorio CCL20 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando cebadores específicos (Genbiotech, **Tabla 3**) y empleando la Master MIX qPCR 2.0- Sybr/ROX (PB-L, Argentina). La reacción (**Tabla 2**) se llevó a cabo en un equipo BioRad CFX96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler (California, EEUU) con el programa que se detalla más adelante.

Tabla 2. Mezcla de reacción para qPCR

Reactivos	Volumen
Primer forward	0, 45 µl
Primer reverse	0, 45 µl
Master MIX qPCR 2.0 – Sybr/ROX	5 µl
Agua libre de RNAsa	2, 6 µl
DNA molde	1, 5 µl

Tabla 3. Cebadores específicos para amplificación.

Gen	Primer forward	Primer reverse
<i>β-actina</i>	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
<i>ccl20</i>	5'-CCAAGAGTTTGCTCCTGGCT-3'	5'-TGCTTGCTGCTTCTGATTCG-3'

Protocolo de qPCR

Temperatura	Tiempo	
95 C°	5 minutos	} 39 ciclos
95 C°	15 segundos	
56 C°	30 segundos	
72 C°	30 segundos	

Se utilizó el gen de la β -actina como control interno para normalizar la variabilidad de los niveles de expresión en cada muestra. Los resultados de expresión relativa se calcularon en base al método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Romanin et al., 2010). La especificidad de los productos de amplificación se verificó mediante las curvas de fusión (curvas de *melting*).

F. ANALISIS ESTADISTICO

Todas las condiciones experimentales, se realizaron por triplicado.

Se utilizó la prueba T para evaluar las diferencias significativas entre las condiciones experimentales utilizando el software Excel (Microsoft).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Composición inicial de la muestra fecal inicial

Tras la secuenciación masiva, el análisis bioinformático de los amplicones obtenidos a partir del ADN bacteriano presente en la materia fecal de los donantes permitió obtener información sobre la composición inicial de la microbiota de los barros fecales. De este modo se pudo evaluar tanto la abundancia relativa de cada muestra individual y de este modo calcular la del *pool* de materia fecal.

Las muestras correspondientes a los cuatro donantes se identifican como Muestra 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Los resultados revelaron diferencias en la abundancia relativa de los *Phyla* bacterianos entre las muestras, como se ilustra en las figuras 4a a 4c:

Para el donante correspondiente a la **muestra 1 (Figura 4a)**, se observa que el *Phylum* con mayor abundancia relativa es *Firmicutes* (58%), seguido en orden decreciente por *Bacteroidota* (35%), *Actinobacteriota* (5%), *Proteobacteria* (1%) y, finalmente, *Verrucomicrobiota* (< 1%), que presenta valores muy bajos.

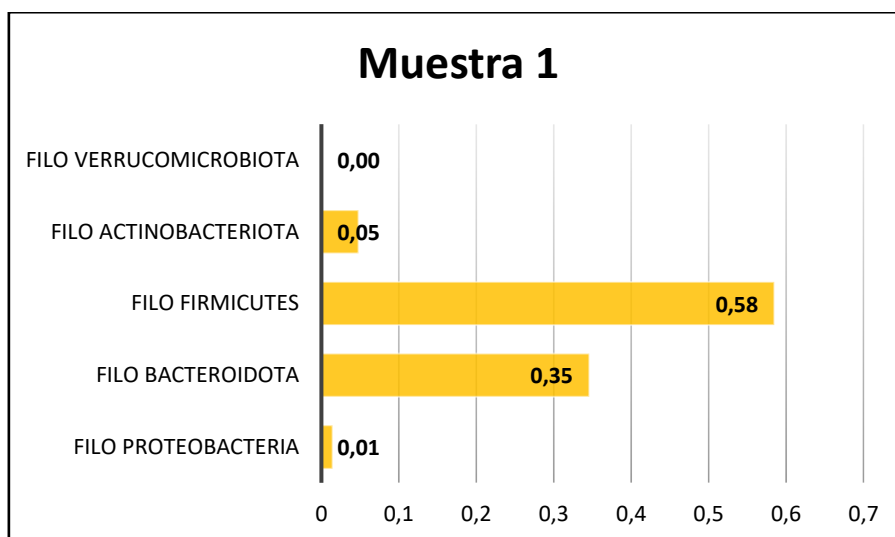


Figura 4a. Abundancia relativa de los principales *Phyla* bacterianos en la microbiota intestinal correspondiente a la muestra 1 de uno de los 4 donantes.

En el caso del donante correspondiente a la **muestra 2 (figura 4b)**, se puede apreciar que el *Phylum* dominante es *Bacteroidota* (50%), seguido por *Firmicutes*, con valores de abundancia relativa muy similares (46%). A continuación, se encuentran *Actinobacteria* con valores más bajos (3%), y finalmente, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobiota*, que presentan proporciones muy bajas (< 1%).

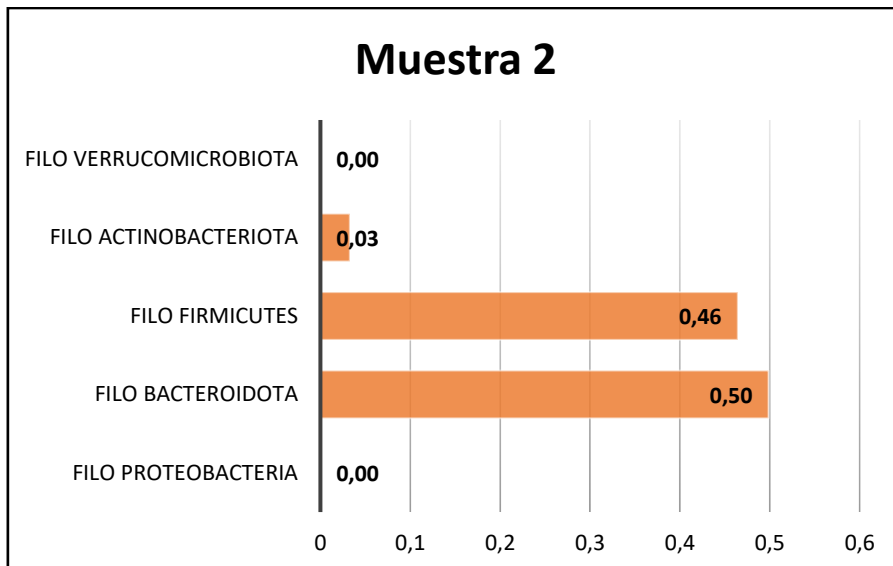


Figura 4b. Abundancia relativa de los principales *Phyla* bacterianos en la microbiota intestinal correspondiente a la muestra 2 de uno de los 4 donantes.

Respecto a la **muestra 3 (figura 4c)**, se observa que, al igual que en la muestra 1, que el *Phylum* con mayor abundancia relativa es *Firmicutes* (51%), seguido de *Bacteroidota* (28%). A continuación, se encuentran en orden decreciente *Verrucomicrobiota* (7%), *Actinobacteria* (6%) y *Proteobacteria* (2%), que presentan valores más representativos en comparación con las muestras 1 y 2.

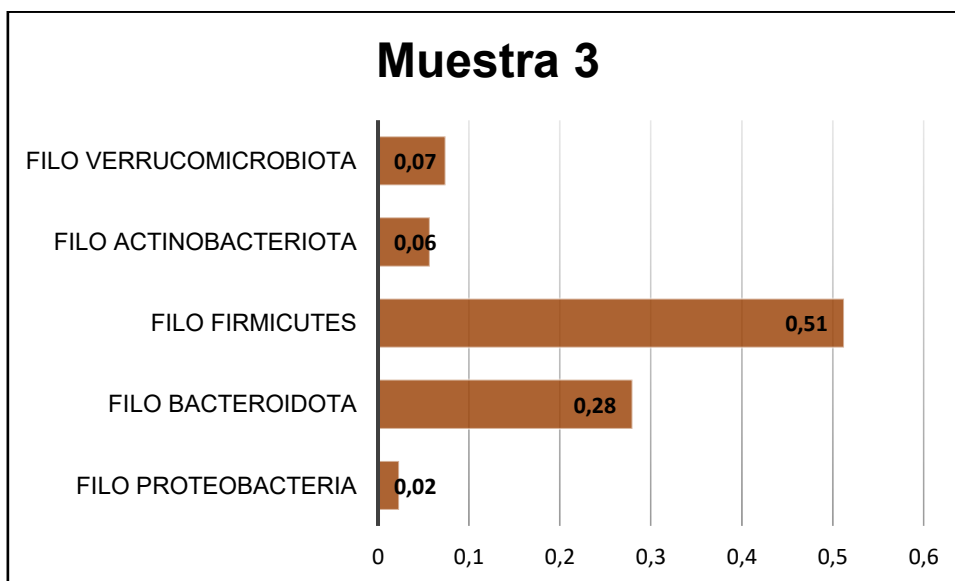


Figura 4c. Abundancia relativa de los principales *Phyla* bacterianos en la microbiota intestinal correspondiente a la muestra 3 de uno de los 4 donantes.

En relación con la **muestra 4 (figura 4d)**, se observa que el *Phylum* con mayor abundancia relativa es *Firmicutes* (67%). Una particularidad notable es que, a diferencia de los casos anteriores, donde *Firmicutes* y *Bacteroidota* eran los *Phyla* predominantes, en este caso *Verrucomicrobiota* ocupa el segundo lugar en términos de abundancia

relativa (17%). Por último, en orden decreciente, se encuentran *Actinobacteria* (9%), *Bacteroidota* (4%) y *Proteobacteria* (< 1%).

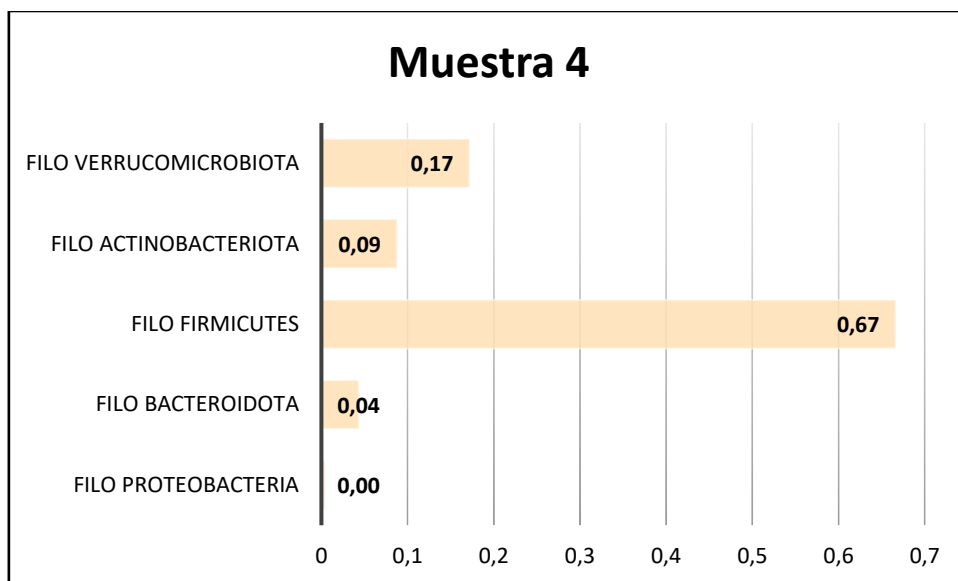


Figura 4d. Abundancia relativa de los principales *Phyla* bacterianos en la microbiota intestinal correspondiente a la muestra 12 de uno de los 4 donantes.

En los individuos donantes de las muestras 1 a 3 se cumple la generalización de que *Firmicutes* y *Bacteroidota* representan juntos cerca del 70% de la población bacteriana (Iebba et al., 2016). En el caso del individuo donante de la muestra 4, esta proporción no se cumple, siendo *Verrucomicrobiota* el segundo *Phylum* en abundancia después de *Firmicutes*. Abundancias relativas altas de *Verrucomicrobiota* han sido reportadas por otros autores como por ejemplo en la zona azul de la Península de Nicoya en Costa Rica (Dickerson et al., 2022), en la población chilena (Fujio-Vejar et al., 2017), llegando incluso a valores excepcionalmente altos cercanos al 20% en algunos individuos en Europa del Este (Quagliariello et al., 2016).

Teniendo en cuenta que el ensayo de fermentación *in vitro* se realizó utilizando como inóculo un *pool* de materia fecal obtenido al combinar las 4 muestras de los donantes, se hizo un promedio de las abundancias relativas de cada uno de los *Phyla* presentes en las muestras individuales de los donantes. Las abundancias relativas de *Phyla* bacterianos presentes en el *pool* se muestran en la **Figura 5**.

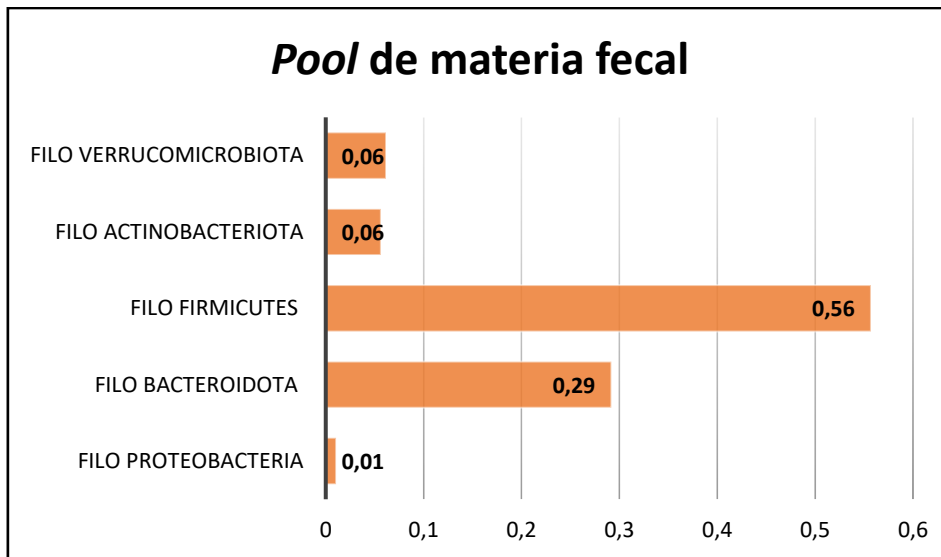


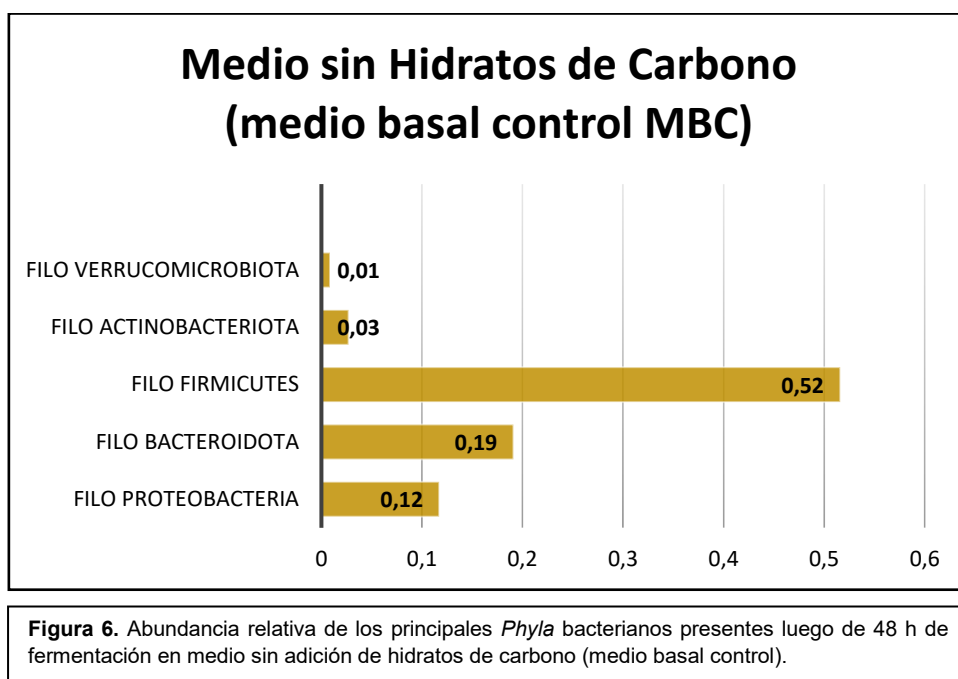
Figura 5. Abundancia relativa de los cinco principales *Phyla* presentes en el *pool* de la materia fecal.

Se observa que, en el *pool* resultante, el *Phylum* bacteriano con mayor abundancia relativa es *Firmicutes* (56%), seguido por *Bacteroidota* (29%) en segundo lugar. Los *Phyla* restantes se encuentran en orden decreciente de abundancia: *Verrucomicrobiota* (6%), *Actinobacteriota* (6%) y, finalmente, *Proteobacteria* (1%). Se puede decir que la abundancia relativa de los *Phyla* es representativa de la que se encuentra en la mayoría de los individuos.

B. Modificación del perfil bacteriano luego de la fermentación *in vitro*

Luego de realizar los experimentos de fermentación *in vitro* durante 48 h, se encontró desarrollo bacteriano en todas las condiciones, lo cual se evidenció mediante el descenso del pH dado por la producción de ácidos orgánicos producto de la fermentación. El pH descendió de 7.5 (inicial) a un promedio de 5.7 ± 0.2 , sin diferencias significativas entre los distintos medios utilizados para la fermentación.

Se analizó la composición de la microbiota en los medios sin azúcar y con los diferentes hidratos de carbono. La abundancia relativa de los principales *Phyla* en el medio basal control sin azúcares se muestra en la **Figura 6**.



Como puede observarse, el *Phylum* con mayor abundancia relativa es *Firmicutes* (52%). A continuación, se encuentran *Bacteroidota* (19%) y *Proteobacteria* (12%), en segundo y tercer lugar, respectivamente. Finalmente, se encuentran *Actinobacteriota* (3%) y *Verrucomicrobiota* (1%), en cuarto y quinto lugar.

Según estos resultados, hay microorganismos que son capaces de desarrollarse en este medio sin carbohidratos, que podrían estar utilizando péptidos presentes en el medio (peptona de carne) como sustrato metabólico. Este desarrollo en medio de cultivo basal ha sido encontrado en trabajos previos (*Al-Tamimi et al., 2006; Medrano et al., 2020; Bengoa et al., 2020*). Teniendo en cuenta este desarrollo en el medio basal, los resultados correspondientes a los otros medios de cultivo conteniendo los diferentes carbohidratos, se compararon con este medio y no al *pool* inicial, ya que en el *pool* hay microorganismos no cultivables.

Con respecto al medio fermentado durante 48 horas con **glucosa** (control positivo) (**figura 7**), y cuando se compara con el medio control sin carbohidratos (MBC) se observa que, el *Phylum* con mayor abundancia relativa continúa siendo *Firmicutes* (48%). En orden decreciente, se encuentran *Proteobacteria* (33%) en segundo lugar, *Actinobacteriota* (8%) en tercer lugar, *Bacteroidota* (7%) en cuarto lugar y *Verrucomicrobiota* en último lugar (1%).

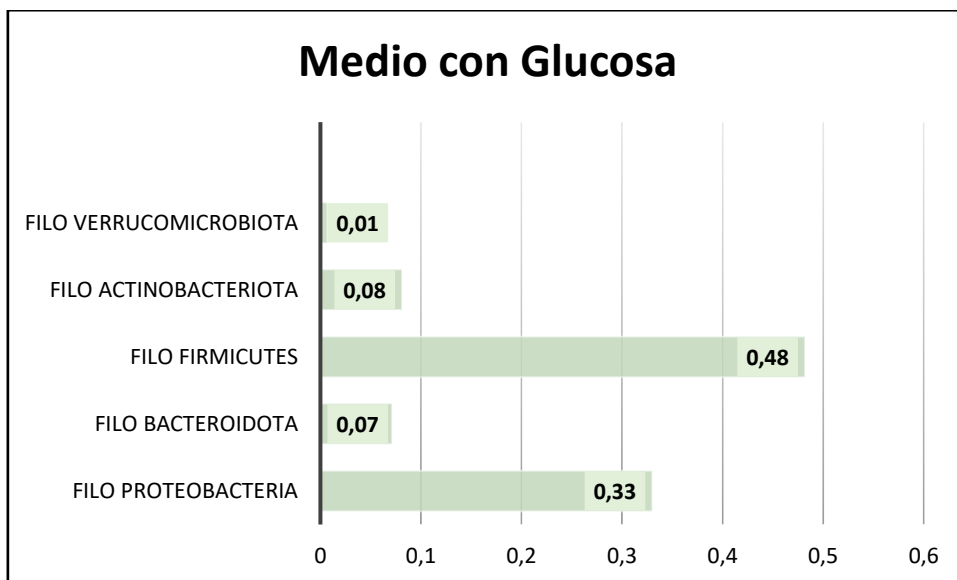


Figura 7. Abundancia relativa de *Phyla* bacterianos en el medio suplementado con glucosa (control positivo) luego de 48 hs de incubación.

En el medio conteniendo β -glucanos, fermentado durante 48 horas, se observa que el *Phylum* con mayor abundancia relativa es *Firmicutes* (73 %), seguido de *Proteobacteria* (10 %), *Bacteroidota* (8 %), *Actinobacteria* (6 %) y *Verrucomicrobiota* (< 1%) (**Figura 8**).

Al comparar esto con la abundancia relativa de los *Phyla* en el medio basal sin azúcares (MCB), se observa que el *Phylum Firmicutes* es un 20% superior en el caso del medio con β -glucanos.

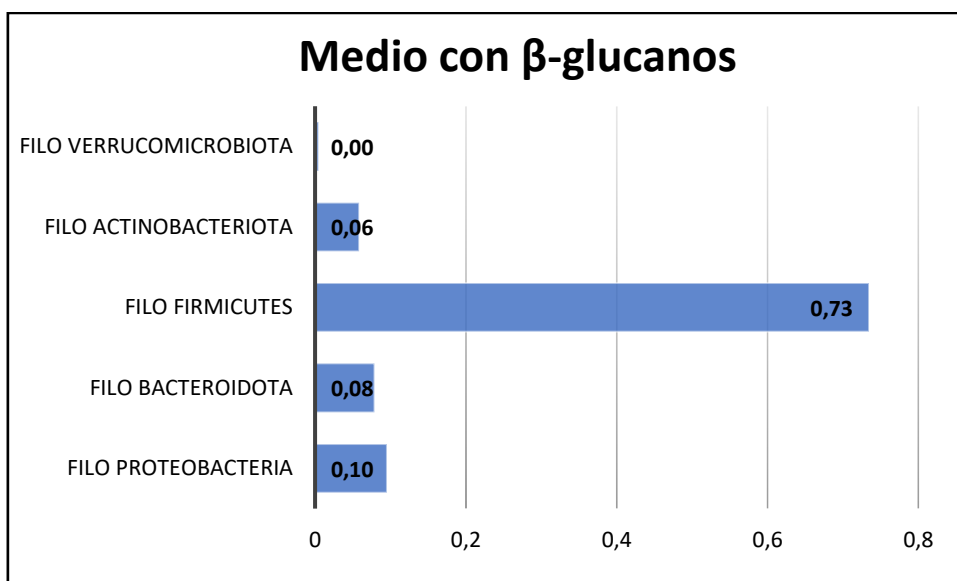


Figura 8. Abundancia relativa de los *Phyla* presentes en el medio suplementado con β -glucanos luego de 48 hs de fermentación.

Finalmente, en el medio control de estímulo de bacterias productoras de butirato (medio con **celobiosa**) (**Figura 9**) se observa que, al igual que en los demás medios, el *Phylum* predominante es *Firmicutes*. Sin embargo, la abundancia relativa de este *Phylum* en este medio sigue siendo menor al encontrado en el medio con β -glucanos. A continuación, se posicionan *Proteobacteria* y *Bacteroidota*, seguidos por *Actinobacteriota* y *Verrucomicrobiota*.

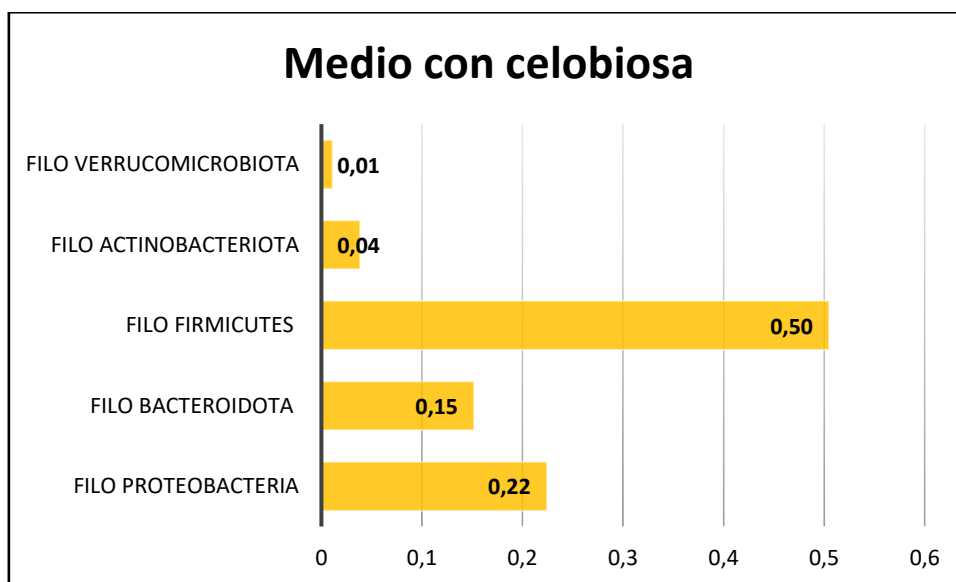


Figura 9. Abundancias relativas de *Phyla* presentes en el medio conteniendo celobiosa tras 48 hs de fermentación.

En base a lo antedicho, se observa que en todas las muestras analizadas, incluyendo el *pool* de materia fecal inicial y las muestras correspondientes a los medios fermentados conteniendo diferentes hidratos de carbono (β -glucanos, celobiosa, glucosa), el *Phylum Firmicutes* es el más abundante. En segundo y tercer lugar, se encuentran los *Phyla Bacteroidota* y *Proteobacteria*, aunque su abundancia varía según la muestra. Estos resultados coinciden con la mayoría de los estudios sobre el microbioma intestinal humano, que señalan que *Firmicutes*, *Bacteroidota* y *Proteobacteria* son los *Phyla* predominantes (Huttenhower et al., 2012). Sin embargo, en una de las muestras de materia fecal cedidas por los donantes (**muestra 4**), se observa una excepción, ya que el *Phylum Verrucomicrobiota* ocupa el segundo lugar. Esta abundancia impactó en la abundancia relativa de este *Phylum* en el *pool*. A su vez, también podemos mencionar que esta composición de la microbiota intestinal se correlaciona con un estado de eubiosis (Conrad & Vlassov, 2015; Gao et al., 2015; Wu et al., 2018), lo que es esperable debido a que las muestras provienen de 4 individuos sanos.

Por otro lado, si se comparan las abundancias relativas del *Phylum Firmicutes* entre los medios sin carbohidratos (52%) y con β -glucanos (73%) se puede concluir que, en las condiciones experimentales, los β -glucanos fueron capaces de incrementar en un 20% la abundancia relativa de este *Phylum* que es en principio benéfico, siendo necesarios otros estudios para comprender la relevancia de este hallazgo.

C. Evaluación de la producción de ácidos grasos de cadena corta

En el colon, la microbiota intestinal fermenta polisacáridos y genera, como producto final, SFCA: ácidos acético, propiónico y butírico. El *pool* de materia fecal proveniente de los cuatro individuos incluidos en el estudio contenía ácidos grasos de cadena corta.

En el tiempo cero (es decir en el inóculo inicial, antes de inocular los medios de cultivo), los valores promedios de ácidos grasos de cadena corta presentes en el *pool* de materia fecal fueron: 2,01 mM de ácido acético, ácido propiónico no detectable y 4,8 mM de ácido butírico.

Luego de inocular los medios de cultivo conteniendo los distintos carbohidratos y luego de cumplirse los diferentes tiempos de incubación (24 y 48 h) se observó un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta por parte de las bacterias intestinales presentes (**Figuras 10, 11 y 12**).

Con el fin de evaluar la producción de ácidos acético, propiónico y butírico, se comparó la producción de estos en medio sin hidratos de carbono y en los medios con β -glucanos, celobiosa e inulina.

En la **figura 10** se muestra la producción de ácido acético para las diferentes condiciones experimentales en función del tiempo. Se puede observar que la presencia de β -glucanos fue la condición en la cual se alcanzó el mayor incremento en la producción de ácido acético, llegando a valores de 5,35 mM a las 24 h y 23,44 mM a las 48 h. Estos valores fueron similares a la condición con inulina (4,08 mM y 22,78 mM de ácido acético a las 24 y 48 h respectivamente). En el medio con celobiosa se produjeron menores cantidades (4,09 mM y 15,89 mM de ácido acético a las 24 y 48 h respectivamente). Como es de esperar, en ausencia de hidratos de carbono es donde se observa la menor producción.

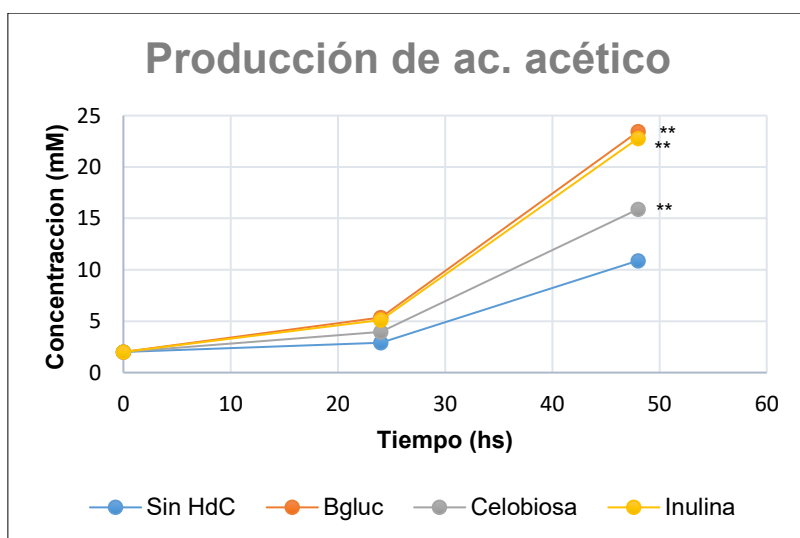


Figura 10. Variación de la producción de ácido acético al cabo de 24 y 48 h. de incubación en comparación con el medio sin hidratos de carbono (MBC) y los medios conteniendo β -glucanos, celobiosa e inulina. Los ** indican diferencias significativas entre las condiciones con carbohidratos y el control MBC.

A partir del análisis estadístico de los resultados, encontramos que hubo diferencias significativas en la producción de *ácido acético* entre el control sin hidratos de carbonos y el grupo de β -glucanos a las 24 y 48 horas de incubación ($P < 0,01$). Lo mismo se observó para las condiciones experimentales con celobiosa e inulina.

En la **figura 11** se observa el aumento en la producción de ácido propiónico en presencia o ausencia de hidratos de carbono. La mayor producción de ácido propiónico se alcanza en presencia de inulina con valores de 6,95 mM y 14,4 mM a las 24 y 48 h de incubación, respectivamente.

Cabe mencionar que la producción de ácido propiónico en presencia de inulina es comparable a la obtenida con β -glucano.

También podemos decir que, en presencia de celobiosa, luego de 24 h de incubación, la producción de ácido propiónico se mantiene constante.

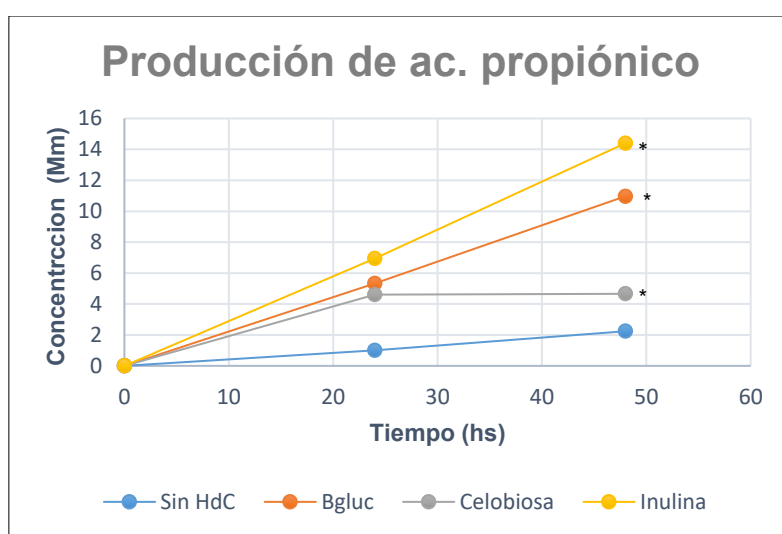
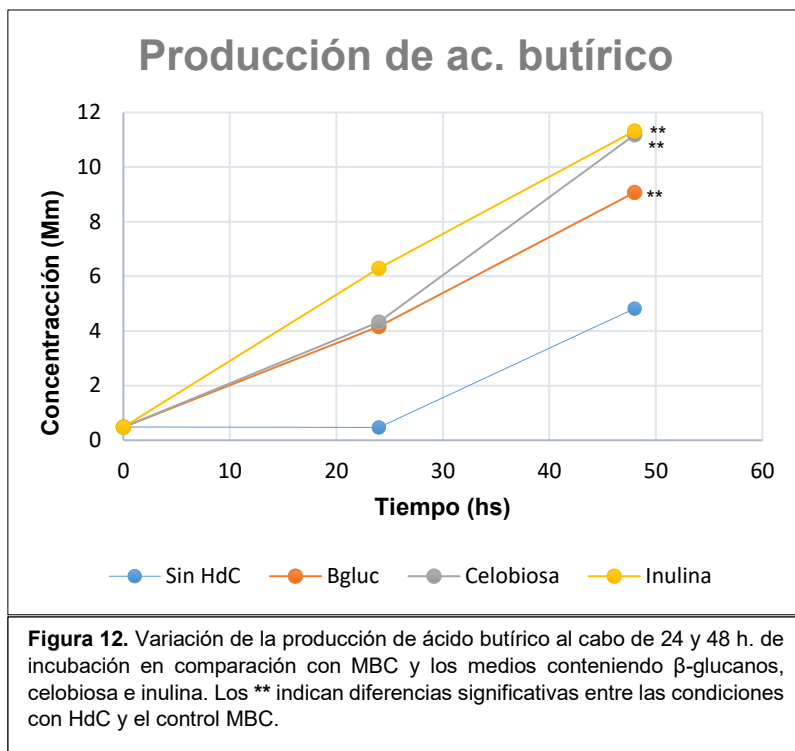


Figura 11. Variación de la producción de ácido propiónico al cabo de 24 y 48 h. de incubación en comparación con MBC y los medios conteniendo β -glucanos, celobiosa e inulina. Los * indican diferencias significativas entre las condiciones con HdC y el control MBC.

Para el caso del *ácido propiónico*, el análisis estadístico reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) en la producción del ácido entre el grupo control (sin hidratos de carbono) y el grupo tratado con β -glucanos, tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación.

Se encontró un comportamiento comparable a lo anterior mencionado para las condiciones con celobiosa e inulina.

La **figura 12** muestra la producción de ácido butírico en función del tiempo para cada una de las condiciones experimentales evaluadas. Se observa que la mayor producción del ácido butírico se alcanza en presencia de inulina, como en el caso anterior, con valores de 6,3 mM y 11,32 mM a las 24 y 48 h, respectivamente. Para el caso de la producción de ácido butírico en presencia de celobiosa y β -glucanos, vemos una mayor producción en presencia de celobiosa en comparación con β -glucanos (6,3 mM a las 24 h y 11,32 a las 48 h para celobiosa y 4,16 Mm y 9,07 mM para β -glucanos a las 24 y 48 h).



En línea con los resultados previos, el análisis estadístico de la cantidad de *ácido butírico* en cada medio mostró las mayores diferencias significativas en la producción del ácido entre el grupo suplementado con β -glucanos y el control sin hidratos de carbonos ($p < 0,01$).

Teniendo en cuenta lo antedicho, podemos afirmar que los experimentos de fermentación produjeron incrementos de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta en comparación a los valores presentes en el *pool* de materia fecal al tiempo cero. Muchos estudios han demostrado que la fermentación de sustratos prebióticos resulta en una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta (*Poeker et al., 2018*).

También, podemos mencionar que, para los 3 ácidos (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico) se obtuvo una mayor producción a las 48 h que a las 24 h. Esto se puede explicar teniendo en cuenta las vías metabólicas de su síntesis. Las bacterias que producen butirato y propionato necesitan utilizar al acetato como sustrato. La producción de acetato requiere, a su vez, de ciertas rutas metabólicas para producirlo. Por lo tanto, es de esperar que se requiera la presencia de precursores para la síntesis de acetato y luego de butirato, y esto explicaría que su producción máxima se alcance recién a las 48 h (*Den Besten et al., 2013*).

En contraste con otros estudios de fermentación *in vitro* (*Jonathan et al., 2012*) que han reportado un pico máximo de producción de ácido acético a las 24 horas, seguido de un descenso hasta las 48 horas, en este estudio se observó un máximo de producción de ácido acético a las 48 horas. Esto podría sugerir que la dinámica de producción de ácido acético puede variar dependiendo de las condiciones experimentales específicas, así como de la microbiota presente en el inoculo inicial y de los carbohidratos utilizados. Sería interesante explorar en próximos estudios si la

prolongación del tiempo de incubación podría influir en la producción de ácido acético, y si los valores de producción de ácido acético descenderían a las 72 horas de incubación, por ejemplo.

Finalmente, podemos afirmar que, según los resultados obtenidos, se mantiene la relación en proporciones de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico de 2:1:1, que previamente fue reportada por previamente otros autores en el grupo de trabajo (Medrano, et., al 2020).

D. Relación entre la producción de ácidos y abundancias de los grupos taxonómicos

Los resultados de la secuenciación de poblaciones bacterianas y los correspondientes a la producción de ácidos orgánicos en los experimentos de fermentación revelan una observación interesante. La secuenciación sugiere que los β -glucanos estimulan la expresión del *Phylum Firmicutes* (Figura 8), que alberga la mayor cantidad de bacterias productoras de butirato (Vital et al., 2014), por lo tanto, se esperaría la mayor producción de butirato en presencia de β -glucanos. Sin embargo, los resultados del análisis de producción de butirato de la fermentación *in vitro* no coinciden con esta expectativa (Figura 12). La producción de butirato en el medio con β -glucanos fue de 9 mM, mayor a la encontrada en el medio sin carbohidratos (5 mM) y menor a la encontrada en el medio con celobiosa (11 mM).

El hecho de que la mayor producción de butirato se observe con la estimulación de celobiosa no es sorprendente, ya que la celobiosa es el control positivo de producción de butirato. Sin embargo, en este caso, no se encontró diferencia en la abundancia relativa de *Firmicutes* en comparación con el medio sin carbohidratos (Figura 9). Al analizar los resultados de la secuenciación en el medio suplementado con celobiosa, se observa que, si bien *Firmicutes* continúa siendo el *Phylum* mayoritario, hay una mayor expresión de los *Phyla Bacteroidota* y *Proteobacteria*, en contraste con el medio suplementado con β -glucanos. Estos hallazgos plantean varias cuestiones interesantes sobre la interacción entre los carbohidratos y la microbiota intestinal.

Para aportar a la comprensión de estos interrogantes se realizó un análisis un poco más profundo considerando las familias que se encuentran dentro de los dos *Phyla* más abundantes (*Firmicutes* y *Bacteroidota*) dentro de los cinco *Phyla* analizados y también a nivel de género para el *Phylum Firmicutes*.

Los resultados de la abundancia relativa para las familias más relevantes del *Phylum Firmicutes* presentes en los medios de cultivo suplementados con β -glucanos, celobiosa y medio sin hidratos de carbono, se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Abundancia relativa de las familias bacterianas más importantes dentro del *Phylum Firmicutes* en medio con β -glucanos, medio con celobiosa y medio sin hidratos de carbono.

<i>Phylum Firmicutes</i>			
Familia	Medio con β -glucanos	Medio con celobiosa	Medio sin azucares
<i>Selenomonadaceae</i>	0,352	0,003	0,003
<i>Veillonellaceae</i>	0,210	0,222	0,222
<i>Acidaminococcaceae</i>	0,115	0,157	0,157
<i>Ruminococcaceae</i>	0,016	0,031	0,031
<i>Lachnospiraceae</i>	0,014	0,033	0,033
<i>Clostridiaceae</i>	0,012	0,002	0,002
<i>Oscillospiraceae</i>	0,007	0,032	0,032
<i>Lactobacillaceae</i>	0,000	0,000	0,000

A partir de los datos presentados en la **Tabla 4** se observa que la familia *Selenomonadaceae* es la más abundante dentro del *Phylum Firmicutes* en el medio con β -glucanos. Al comparar la expresión de esta familia en otras condiciones (medios con celobiosa y sin hidratos de carbono), se observa que la abundancia relativa de esta Familia en los medios con celobiosa o ausencia de hidratos de carbono es menor. En el medio con β -glucanos y en segundo lugar en abundancia, se encuentra la Familia *Veillonellaceae*, con una abundancia relativa similar en los tres medios. Un patrón similar se observa en la Familia *Acidaminococcaceae*, mientras que en el caso de las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* la abundancia relativa en el medio con β -glucanos es levemente menor a la que se encuentra en los otros medios. Las Familias *Clostridiaceae*, *Oscillospiraceae* y *Lactobacillaceae* presentan una abundancia relativa muy baja en las condiciones evaluadas.

Considerando lo anterior, podemos decir que la Familia *Selenomonadaceae* es la de mayor abundancia relativa en el medio con β -glucanos, y si bien esta Familia (cuya conformación taxonómica es relativamente nueva), no está relacionada directamente con la producción de butirato, existen trabajos recientes (*Hackman, 2023*) que describieron vías metabólicas no típicas en algunos géneros de esta Familia concluyendo que algunas cepas pueden producir butirato. Esto explicaría por qué, por un lado, los β -glucanos estimulan la expresión del *Phylum Firmicutes*, pero los géneros y familias que típicamente se relacionan con la producción de butirato como son *Roseburia* (Familia *Lachnospiraceae*) *Fecalibacterium* (Familia *Ruminococaceae*) y *Clostridium butyricum* (Familia *Clostridiaceae*) (*Rueda Villabona et al., 2024*) no se encuentran incrementados.

Cabe mencionar que la Familia *Veillonellaceae* (ubicada en segundo lugar en abundancia en el medio conteniendo β -glucanos) es una familia que incluye especies productoras de butirato como *Veillonella atypica* (Chen et al., 2023).

Respecto a la condición con celobiosa en el experimento de fermentación y producción de ácidos, se observó que se lograron obtener los mayores niveles de butirato en comparación con los β -glucanos (Figura 12). Además, se detectó un aumento en las proporciones de *Bacteroidota* y *Proteobacteria*, mientras que disminuyó la proporción de *Firmicutes* para la misma condición (Figura 9). Esto sugiere que el aumento en la producción de butirato podría estar relacionado con el aumento de *Bacteroidota* y *Proteobacteria*. Para explorar esta hipótesis, se realizó un análisis más detallado de uno de estos *Phyla* a nivel de Familia.

En la **Tabla 5** se presentan los resultados de las abundancias relativas para las familias que alberga el *Phylum Bacteroidota*.

Tabla 5. Abundancia relativa de familias dentro del *Phylum Bacteroidota* en medio con β -glucanos, medio con celobiosa y medio sin hidratos de carbono.

Phylum Bacteroidota			
Familia	Medio con β -glucanos	Medio con celobiosa	Medio sin hidratos de carbono
<i>Bacteroidaceae</i>	0,029	0,069	0,134
<i>Prevotellaceae</i>	0,034	0,052	0,013
<i>Rikenellaceae</i>	0,003	0,014	0,018
<i>Tannerellaceae</i>	0,000	0,014	0,022
<i>Flavobacteriaceae</i>	0,012	0,001	0,001

Según se observa en la **Tabla 5**, las Familias *Bacteroidaceae* y *Prevotellaceae* presentan una abundancia relativa alta en comparación con las demás. *Bacteroidaceae* muestra una mayor expresión en el medio sin hidratos de carbono, en comparación con las condiciones que incluyen β -glucanos o celobiosa. Por otro lado, *Prevotellaceae* presenta una mayor expresión en la condición con celobiosa, en comparación con la condición sin hidratos de carbono y con β -glucanos.

La Familia *Prevotellaceae* alberga al género *Prevotella*, conocido por contener bacterias productoras de butirato (Chen et al., 2023). Como se mencionó anteriormente, la Familia *Prevotellaceae* presenta una de las mayores abundancias relativas en las condiciones experimentales de este trabajo y se expresa en mayor abundancia en presencia de celobiosa que en presencia de β -glucanos.

Este aumento en la abundancia relativa del *Phylum Bacteroidota* en el medio suplementado con celobiosa en comparación con el medio con β -glucanos podría correlacionarse con la mayor producción de butirato en la condición con celobiosa en comparación con la condición con β -glucanos en los experimentos de fermentación. La importancia del género *Prevotella* en la producción de butirato fue reportada por otros autores (Rueda Villabona et al., 2024).

E. Evaluación del efecto de los ácidos en la respuesta inmune

La modificación de la microbiota intestinal tiene un impacto metabólico que conduce a la producción de diferentes perfiles de SFCA como acetato, propionato y butirato. Estos compuestos tienen propiedades antiinflamatorias.

Para evaluar el efecto de los ácidos grasos de cadena corta producidos en la modulación de la respuesta inflamatoria se estudió la expresión de los genes de la quimioquina CCL20, factor quimioattractante que liberan las células epiteliales en condiciones inflamatorias (*Rumbo et al., 2004*), mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó como estímulo inflamatorio la presencia o ausencia de flagelina.

Lamentablemente, no fue posible evaluar el efecto inmunomodulador del butirato debido a problemas técnicos durante la q-PCR, a pesar de que las muestras parecían estar en condiciones óptimas inicialmente. Los resultados de la expresión de CCL20 se presentan en la **Figura 13**.

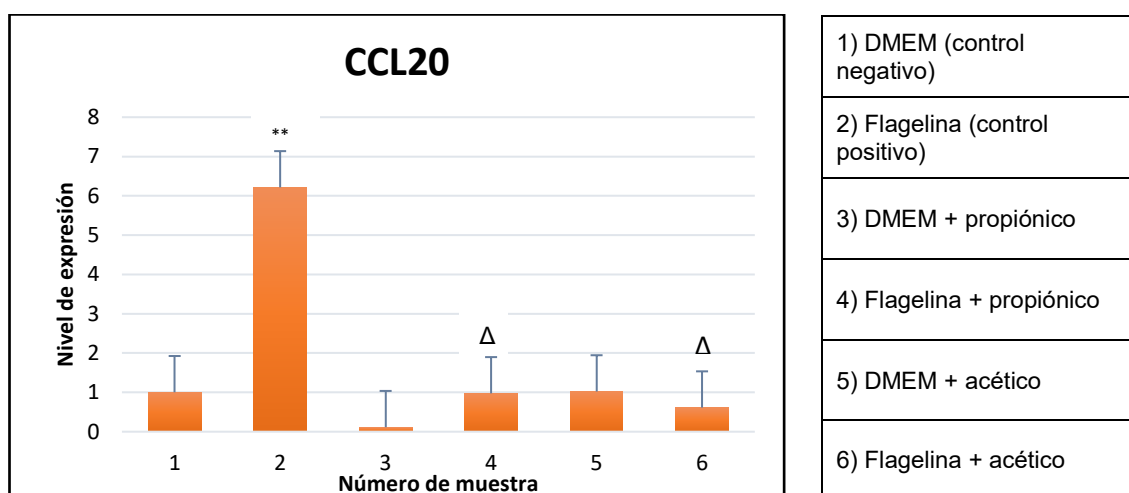


Figura 13. Expresión de CCL20 en células Caco-2/TC-7, en medio DMEM con estímulo o no de flagelina en presencia o no de ácidos propiónico y acético. Los ** muestran diferencias significativas entre el medio DMEM sin flagelina y con flagelina (controles). Los Δ muestran diferencias entre el medio DMEM estimulado con flagelina y los medios que albergan los diferentes ácidos en presencia de flagelina.

Según se observa en la **Figura 13**, la expresión de CCL20 aumenta significativamente al comparar el medio sin flagelina (**1**) con el medio con flagelina (**2**), lo que es consistente con el papel proinflamatorio de la flagelina ($P < 0,01$). Se observa una reducción en la expresión de CCL20 al comparar el medio con flagelina (**2**) con el medio con flagelina + ácido propiónico (**4**) o ácido acético (**6**), lo que sugiere un papel antiinflamatorio de estos ácidos, a las concentraciones ensayadas. Los resultados del análisis estadístico revelan diferencias significativas entre las condiciones evaluadas ($P < 0,01$).

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede inferir que los ácidos grasos de cadena corta (SFCA) ejercen un efecto inmunomodulador en la respuesta inmune, ya que los niveles de expresión de la quimioquina proinflamatoria CCL20 disminuyen en presencia de ácido acético y ácido propiónico. Estos hallazgos se alinean con estudios previos que han demostrado que ciertos SFCA, como el butirato, modulan la secreción de citoquinas en células monocleares estimuladas con lipopolisacáridos (LPS), un estímulo proinflamatorio (*Kovarik et al., 2011*). Asimismo, estos resultados concuerdan con los

observados en estudios realizados previamente con SCFA en células Caco-2 (*Iraporda et al. 2014*).

CONCLUSIONES

En este trabajo, se evaluó la fermentación de β -glucanos por parte de la microbiota intestinal y su efecto en la modulación de las poblaciones microbianas, en la producción de ácidos grasos de cadena corta y en la modulación de la respuesta inmune por parte de estos ácidos producidos. A partir del cumplimiento de los objetivos, se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

- Se determinó la composición inicial de las poblaciones bacterianas en las muestras individuales de los donantes y en el *pool* de materia fecal, así como después de la fermentación *in vitro*. En todos los casos, el *Phylum* mayoritario fue *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes* (exceptuando un caso) lo que coincide con la mayoría de los trabajos descritos hasta el momento.
- Los β -glucanos fueron fermentados por las bacterias intestinales del *pool* de materia fecal de los 4 donantes, lo que produjo un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta en comparación con un medio sin hidratos de carbono.
- La producción de butirato en el medio con β -glucanos fue significativamente mayor a la encontrada en el medio sin carbohidratos y menor a la encontrada en el medio con celobiosa (control positivo para la producción de butirato). Sin embargo, la cantidad de butirato producida en el medio con β -glucanos (9 mM) representa un valor que permite concluir que estos polisacáridos estimulan positivamente la producción de butirato.
- En el medio conteniendo los β -glucanos se observó un incremento significativo de la abundancia relativa del *Phylum Firmicutes*. Si bien las poblaciones típicas productoras de butirato no se vieron incrementadas, su producción podría atribuirse a vías no típicas de producción de butirato presentes en las familias cuya abundancia relativa se vio incrementada (*Selenomonadaceae* y *Veillonellaceae*).
- Los ácidos propiónico y acético mostraron una capacidad para modular la activación de células epiteliales intestinales inducida por un estímulo proinflamatorio, evidenciada por la disminución de la expresión de la quimoquina CCL20.

BIBLIOGRAFIA

- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., & Barnich, N. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. *Scientific reports*, 6(1), 19032.
- Al-Tamimi, MA, Palframan, RJ, Cooper, JM, Gibson, GR, Rastall, RA (2006). *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *J Appl Microbiol* 100, 407-414.
- Bengoa AA, Dardis C, Gagliarini N, Garrote GL, Abraham AG. Exopolysaccharides from *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir as potential bioactive compounds for microbiota modulation. *Front Microbiol*. 2020;11:583254.
- Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 2016, 13, 581–583
- Chen, B. J., Takeshita, T., Tajikara, T., Asakawa, M., Kageyama, S., Shibata, Y., ... & Yamashita, Y. (2023). Butyrate as a potential driver of a dysbiotic shift of the tongue microbiota. *Msphere*, 8(1), e00490-22.
- Cerletti, C., Esposito, S., & Iacoviello, L. (2021). Edible mushrooms and beta-glucans: Impact on human health. *Nutrients*, 13(7), 2195.
- Chen D, Jin D, Huang S, et al. (2020). *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota. *Cancer letters*, 469, 456-467.
- Código Alimentario Argentino: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Collado MC, Rautava, S, Aakko, J, Isolauri, E, Salminen, S (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, 6, e23129.
- Conrad R, Vlassov A (2015) The Human Microbiota: Composition, Functions, and Therapeutic Potential. *Med Sci Rev*, 2015;2: 92-103.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., et al. (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505:559–563.
- Dickerson, F., Dilmore, A. H., Godoy-Vitorino, F., Nguyen, T. T., Paulus, M., Pinto-Tomas, A. A., ... & Jeste, D. V. (2022). The microbiome and mental health across the lifespan. In *Microorganisms and mental health* (pp. 119-140). Cham: Springer International Publishing.
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9), 2325-2340.
- Donohoe, DR, Collins, LB, Wali, A, Bigler, R, Sun, W, Bultman, SJ (2012). The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular Cell* 48, 612–626.
- Duncan, SH, Louis, P, Flint, HJ (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied & Environmental Microbiology*, 70(10), 5810-5817.
- Farup, PG, Rudi, K, Hestad, K (2016). Faecal short-chain fatty acids - a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome? *BMC Gastroenterol*, 16: 51-57.
- Gao, Z, Guo, B, Gao, R, Zhu, Q, Qin, H (2015). Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, 6, 20.
- Gibson, GR, Hutkins, R, Sanders, ME, Prescott, SL, Reimer, RA, Salminen, SJ, et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491.
- Fujio-Vejar, S., Vasquez, Y., Morales, P., Magne, F., Vera-Wolf, P., Ugalde, J. A., ... & Gotteland, M. (2017). The gut microbiota of healthy Chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia. *Frontiers in microbiology*, 8, 1221.
- Hackmann, T. J. (2023). New biochemical pathways for forming short-chain fatty acids during fermentation in rumen bacteria. *JDS communications*, 5(3), 230-235.
- Hosseinkhani, F., Heinken, A., Thiele, I., Lindenburg, P. W., Harms, A. C., & Hankemeier, T. (2021). The contribution of gut bacterial metabolites in the human immune signaling pathway of non-communicable diseases. *Gut microbes*, 13(1), 1882927.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, et al. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486: 207–214.
- Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., ... & Schippa, S. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol*, 39(1), 1-12.
- Iraporda, C., Romanin, D. E., Rumbo, M., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2014). The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Research International*, 62, 247-253.
- Jan, G. B. A. S., Belzacq, A. S., Haouzi, D., Rouault, A., Metivier, D., Kroemer, G., & Brenner, C. (2002). Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 9(2), 179-188.
- Jonathan, M. C., van den Borne, J. J., van Wiechen, P., da Silva, C. S., Schols, H. A., & Gruppen, H. (2012). In vitro fermentation of 12 dietary fibres by faecal inoculum from pigs and humans. *Food Chemistry*, 133(3), 889-897.
- Khan, T., Date, A., Chawda, H., & Patel, K. (2019). Polysaccharides as potential anticancer agents—a review of their progress. *Carbohydrate Polymers*, 210, 412–428.
- Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M., & Kim, C. H. (2013). Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*, 145(2), 396-406.

- Kovarik, J.J., Tillinger, W., Hofer, J., Holzl, M.A., Heinzl, H., Saemann, M.D., et al., 2011. Impaired anti-inflammatory efficacy of n-butyrate in patients with IBD. *Eur. J. Clin. Invest.* 41 (3), 291–298.
- Manrique Vergara, David, & González Sánchez, María Eugenia. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición Hospitalaria*, 34(Supl. 4), 58-61.
- Martinez, I., Stegen, J.C., Maldonado-Gomez, M.X., Eren, A.M., Siba, P.M., Greenhill, A.R., and Walter J. (2015) The gut microbiota of rural Papua New Guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep* 11:527–538.
- Mayer, E. A., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation*, 125(3), 926-938.
- Medrano M, Gangoiti M, Simonelli, N., & Abraham, A. G. (2020). Kefiran fermentation by human faecal microbiota: Organic acids production and in vitro biological activity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 24, 100229.
- Moran N., and Sloan, D. (2015) The hologenome concept: helpful or hollow? *PLoS Biol* 13: e1002311.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667-685.
- Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N. J., & Laffey, J. G. (2020). β -glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application. *Journal of Fungi*, 6(4), 356.
- Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsugi, K., Ogawa, T., et al. (2018). β -Glucan in foods and its physiological functions. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), 8–17.
- Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Aug 9;2:104. doi: 10.3389/fcimb.2012.00104. PMID: 22919693; PMCID: PMC3417542.
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., ... & Hermoso, M. A. (2019). Corrigendum: Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 1486.
- Poeker, SA, Geirnaert, A., Berchtold, L., Greppi, A., Krych, L., Steinert, RE, ... y Lacroix, C. (2018). Entendiendo el potencial prebiótico de diferentes fibras dietéticas usando un modelo de fermentación continua in vitro para adultos (PolyFermS). *Scientific reports*, 8 (1), 4318.
- Quagliariello, A., Aloisio, I., Bozzi Cionci, N., Luiselli, D., D'Auria, G., Martinez-Priego, L., ... & Di Gioia, D. (2016). Effect of Bifidobacterium breve on the intestinal microbiota of coeliac children on a gluten free diet: a pilot study. *Nutrients*, 8(10), 660.
- Reymar Martin (2023). "Fibra dietaria no digerible: Impacto en la microbiota y metabolitos asociados a patologías intestinales" TIF Lic. en Bioquímica UNAJ. Directora: Dra. Micaela Medrano. Codirectora: Dra. Judith Piernaria.
- Rueda-Villabona, J. D., Suárez, J. C. G., Molina-Quintero, L. R., & de Biotechnología, G. Diversidad de la microbiota intestinal: características, funciones y su potencial como biomarcador para nuevas terapias.
- Rumbo, M., Siervo, F., Debar, N., Kraehenbuhl, J. P., & Finke, D. (2004). Lymphotoxin β receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 127(1), 213-223.
- Sanders ME, Merenstein DJ, Reid, G, Gibson GR, Rastall RA (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 16, 605-616.
- Srivastava, S., Singh, A., Sandeep, K., & Yadav, D. (2021). Epigenetic Regulation of Gut Microbial Dysbiosis. *Indian Journal of Microbiology*, 61, 125-129.
- Schnorr, S.L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., et al. (2014) Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 5: 1–12.
- Siddiqui, M. T., & Cresci, G. A. (2021). The immunomodulatory functions of butyrate. *Journal of inflammation research*, 6025-6041.
- Soderholm, A. T., & Pedicord, V. A. (2019). Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. *Immunology*, 158(4), 267-280.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O., Bermúdez-Humarán L.G., Gratadoux J.J., et al. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 16731-16736.
- Thomas, S., Rezoagli, E., Abidin, I. Z., Major, I., Murray, P., & Murphy, E. J. (2022). β -Glucans from yeast—immunomodulators from novel waste Resources. *Applied Sciences*, 12(10), 5208.
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, 81(3), 1031-1064.
- Turnbaugh, P., Ley, R., Mahoeald, M.A., Magrini, E.R., and Gordon, J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027–1031.
- Tunaru, S., Kero, J., Schaub, A., Wufka, C., Blaukat, A., Pfeffer, K., & Offermanns, S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nature medicine*, 9(3), 352-355
- Van der Hee, B., & Wells, J. M. (2021). Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. *Trends in Microbiology*, 29(8), 700-712.
- Vital, M., Howe, A. C., & Tiedje, J. M. (2014). Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta) genomic data. *MBio*, 5(2), 10-1128.
- Wang, H., Chen, G., Li, X., Zheng, F., & Zeng, X. (2020). Yeast β -glucan, a potential prebiotic, showed a similar probiotic activity to inulin. *Food & Function*, 11, 10386–10396.
- Wu, X, Wu, Y, He, L, Wu, L, Wang, X, Liu, Z (2018). Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 9(14), 2510.

- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y., Keilbaugh, S.A., et al. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105–108.
- Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., & Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(2), 505-521.
- Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7493-7519.
- Zimmermann, P., & Curtis, N. (2019). The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota—a systematic review. *Journal of Infection*, 79(6), 471-489.
- Zmora, N., Suez, J., & Elinav, E. (2019). You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(1), 35-56.
- Zhu, A., Sunagawa, S., Mende, D.R., and Bork, P. (2015) Inter-individual differences in the gene content of human gut bacterial species. *Genome Biol* 16: 82.