



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

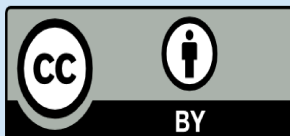
Reymar, Martin Oscar

Fibra dietaria no digerible: Impacto en microbiota y metabolitos asociados a patologías intestinales

2023

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



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

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

Cita recomendada:

Reymar, M. O. (2023). *Fibra dietaria no digerible: Impacto en microbiota y metabolitos asociados a patologías intestinales* [Tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



Instituto de Ciencias de la Salud
Bioquímica

Trabajo final:

“Fibra dietaria no digerible: Impacto en la microbiota y metabolitos asociados a patologías intestinales”

Estudiante: Martin Reymar
Directora: Dra. Micaela Medrano
Codirectora: Dra. Judith Piermaria

Agradecimientos

Puede que esta sea la parte que más me cueste escribir por lo difícil que resulta poner en palabras lo que siento y a todas las personas que estuvieron ahí conmigo en estos años. Algunos continúan hasta hoy, otros se quedaron en el camino, pero todos a su manera, sea mala o buena, contribuyeron y me ayudaron a llegar hasta este momento.

Primero que nada, agradecer a mis viejos, que, desde el fin de la secundaria, me aguantaron el estrés, el malhumor, las corridas y me apoyaron incondicionalmente en este camino que elegí. A Mau, mi hermano, a él y a su “wu ji bi fan” que me decía junto con “mucho de algo no es bueno” para que suelte un poco el estudio y me relaje en los momentos de estrés. A Marcos, mi hermano más chico, que con sus ocurrencias y chistes me hacía reír en los momentos que más lo necesitaba. A mis bebes de 4 patas Tomy y Leo, que tienen una magia para hacerme sonreír sin emitir palabras y demostrar amor constantemente. A mis primas, Lula, Ne, Cata; a la baba y la nona; mi madri Lau, al tío Ari y tía Pato, a todos, gracias por su apoyo y su constante aliento en mis estudios.

Obvio no podía terminar de agradecer a mi familia si no agradecía a mi compañera de vida, Melo, mi novia, que desde el primer día de conocernos me alentó en mis estudios, mis proyectos y locuras juntos, y que hace 3 años me transmite la paz que necesitaba para transitar cada momento.

Gracias a Jaz, mi mejor amiga, que desde los 15 años me banca en todas, festejando las buenas y corrigiéndome en las malas como también obligándome a salir de casa para sacarme un rato de los apuntes y los libros. A Cami, mi amiga, compañera de cursadas, mi dúo de estudio y esperemos que de residencia, gracias por ayudarme como nadie a transitar materias y a complementar todo lo que estudiábamos con las tardes de mates en casa y en el salón de estudios. A Seba, Adri, Dani y Mai que aunque andamos distanciados de las juntadas y las vacaciones juntos, son de las personas más hermosas que me trajo la UNAJ a mi vida y con los que pase cursadas llenas de risas, simplemente gracias amigos.

Por supuesto que no hubiese llegado a este punto sin mis profesores que sostuvieron el interés en enseñarme y me transmitieron todo su amor por la carrera. Gracias a todos por formarme como profesional y como persona, como también a la UNAJ por permitirme llevar a cabo mis estudios y ser mi segunda casa durante estos años. Y no podría terminar de dar méritos a las personas que me ayudaron a llegar hasta acá sin agradecer a mis directoras de este trabajo, Mica y Judith, que estuvieron siempre ahí, corriendo con el papeleo para presentarnos en la beca CIN, para ayudarme en todas mis dudas como también en mis líos en el laboratorio, gracias por estos meses de entrenamiento y por mostrarme el mundo de la investigación. Asimismo, agradecer al CIDCA por permitirme llevar a cabo este trabajo y desarrollar mi beca de entrenamiento.

Gracias a la gente que me apoya en el instagram dedicado a la carrera que arme, que si bien lo hice a modo de aportar interés en estos estudios y dar aliento a seguir, me devuelven muchos comentarios de apoyo en estos últimos años de carrera, gracias, de verdad.

Por último, pero no menos importante, agradecerles a mis alumnos del colegio, que si bien cumpla mi rol enseñándoles, siempre quisieron acercarse y estar al tanto de cómo me iba en la carrera, en la confección de este trabajo y alentándome para seguir adelante.

Muchísimas gracias a todos por estar,

Martin

RESUMEN

Se denomina “fibra dietaria no digerible” a oligosacáridos y polisacáridos que, debido a las uniones químicas que presentan, no pueden ser digeridos por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal y que, por lo tanto, llegan al colon donde pueden ser fermentados por la microbiota intestinal.

La “microbiota intestinal” es el conjunto de microorganismos que habitan el intestino grueso en una relación con el hospedador que, en estado de equilibrio (*eubiosis*), resulta benéfica recíprocamente y presenta una gran cantidad de funciones. La inmunomodulación, la protección contra organismos patógenos, la regulación en la digestión y la producción de moléculas benéficas para el organismo hospedador, son algunas de las funciones que son capaces de llevar a cabo este conjunto de microorganismos habitantes del intestino. Se reconoce que existe una importante relación entre estos microorganismos y el estado de salud del hospedador, en la cual los desbalances de esa microbiota (*disbiosis*) pueden conducir al origen de patologías intestinales. Las bacterias no benéficas que se ven favorecidas en estados de *disbiosis* secretan sustancias que reclutan células del sistema inmune, y comienza a desarrollarse una inflamación crónica. En el estado de inflamación crónica se pierde la integridad de la barrera intestinal y puede ser el origen de varias patologías. Dentro de las afecciones y patologías intestinales desencadenadas por este desequilibrio se pueden mencionar: colon irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cáncer de colon, entre otras.

Como consecuencia de la fermentación de carbohidratos por parte de la microbiota intestinal benéfica, se generan ácidos orgánicos de cadena corta. Uno de ellos es el ácido butírico o butirato, para el cual se ha observado un rol importante en el control sobre la proliferación de las células tumorales del intestino, induciendo apoptosis. Existe evidencia de que el consumo de fibra no digerible y fermentable es capaz de estimular la producción de este metabolito o estimular el desarrollo de un mayor número de células de las poblaciones bacterianas productoras.

El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de estudiar la fermentabilidad de diferentes fibras dietarias no digeribles utilizando microbiota intestinal proveniente de individuos con patologías intestinales neoplásicas o preneoplásicas. Como medida de la fermentabilidad, se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos de cadena corta producidos. Para evaluar la actividad biológica de dichos ácidos, se realizaron ensayos *in vitro* utilizando células neoplásicas intestinales en cultivo y se evaluó la viabilidad de las células mediante cuantificación de la integridad de membrana plasmática y la actividad mitocondrial.

Índice

1. Introducción.....	5
1.1. Marco Teórico	
1.3 Hidratos de Carbono y Fibras no Digeribles	5
1.4 Composición y Característica de las fibras	6
1.5 Fermentabilidad de las Fibras	8
1.6 Microbiota y salud intestinal.....	8
1.7 Actividad biológica de los productos de fermentación.....	9
1.8 Respuesta individual de la microbiota.....	10
2.Objetivos	11
3.Materiales y Métodos.....	12
3.1 Obtención de las fibras.....	12
3.1.1 Obtención de kefiran.....	12
3.1.2 Obtención de dextrano.....	12
3.1.3 Obtención de β -glucanos.....	12
3.2 Caracterización de las fibras.....	13
3.2.1 Determinación del peso molecular.....	13
3.2.2 Determinación de la composición química por TLC.....	13
3.2.3 Determinación de proteínas por Bradford.....	14
3.2.4 Cuantificación de carbohidratos por Antrona.....	15
3.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> : simulación del pasaje gastrointestinal.....	16
3.4 Simulación <i>in vitro</i> de fermentación intestinal.....	17
3.4.1 Preparación del medio de cultivo.....	17
3.4.2 Fermentación <i>in vitro</i> por bacterias intestinales.....	17
3.5 Cuantificación de productos de fermentación.....	18

3.6 Actividad biológica <i>in vitro</i> de los productos de fermentación.....	19
3.6.1 Cultivos celulares.....	19
3.6.2 Ensayo de actividad biológica en células.....	19
3.6.3 Determinación de viabilidad celular por tinción.....	19
3.6.4 Determinación de actividad mitocondrial.....	20
Estadística.....	20
Salvaguarda y ética ambiental.....	20
4. Resultados y discusión.....	21
4.1 Caracterización de polisacáridos.....	21
4.1.1 Cuantificación de carbohidratos.....	21
4.1.2 Contenido de proteínas.....	22
4.1.3 Calculo de rendimiento.....	23
4.1.4 Peso molecular	23
4.1.5 Composición de azúcares.....	25
4.2 Simulación por el pasaje gastrointestinal.....	25
4.3 Fermentación <i>in vitro</i>	26
4.3.1 Acidificación del medio de fermentación.....	27
4.3.2 Contenido de ácidos orgánicos.....	28
4.3.3 Contenido de ácidos orgánicos en la materia fecal inicial.....	30
4.3.4 Producción de ácidos orgánicos por fermentación de fibras.....	31
4.3.5 Comparación de perfiles de fermentación individuales.....	32
4.4 Ensayo de actividad biológica: viabilidad celular.....	50
5 Conclusiones	52
6 Referencias bibliográficas.....	53

MARCO TEÓRICO

Bajo la denominación de “fibra dietaria no digerible” se incluye a todos aquellos oligo y polisacáridos incapaces de ser digeridos por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal de los seres humanos. Este hecho conlleva la capacidad de estas moléculas de llegar intactas al intestino grueso y tener contacto con la microbiota intestinal. En este microambiente conformado principalmente por bacterias, hongos y algunos virus, ciertas bacterias pueden utilizar como sustrato metabólico a las fibras ingeridas. Entre los productos de este metabolismo se encuentran ácidos grasos de cadena corta y ácidos orgánicos (como el ácido láctico) que traen consigo diversos beneficios para la salud del consumidor. A su vez, la ingesta de fibra no digerible promueve el desarrollo de determinadas poblaciones bacterianas favoreciendo el estado de *eubiosis*. Gracias a esta particularidad que presentan algunas fibras de mejorar la integridad de la microbiota y conferir un beneficio adicional a la salud del consumidor, es que algunas de éstas reciben la denominación de “prebióticos” (Gibson & Roberfroid, 1995; Gibson *et al.*, 2017). El consumo de estos compuestos ha tenido tal relevancia en las últimas décadas que en el año 2011 fueron incluidos en el Código Alimentario Argentino (Capítulo XVII, Art 13-0 - Res. Conj. SPReI 229/2011 y SAGyP 731/2011). La correlación entre el consumo de fibra y la buena salud se sustenta en la gran cantidad de trabajos científicos que relacionan su consumo con el favorecimiento de crecimiento y actividad de poblaciones bacterianas benéficas en el tracto intestinal, donde los metabolitos producidos han demostrado disminuir la incidencia de diversas patologías intestinales (Patel & Goyal, 2012; Sanders *et al.*, 2019), entre ellas, el cáncer colorrectal, así como otras patologías intestinales de origen inflamatorio. Actualmente se reconoce que varios tipos de enfermedades inflamatorias crónicas (colitis, obesidad, infección y enfermedades autoinmunes) pueden aumentar la incidencia de padecer cáncer de colon (Park *et al.*, 2010; Chen & Vitetta, 2018).

Las dietas ricas en fibra se correlacionan con el incremento en la producción de butirato y, al mismo tiempo, con la reducción de la incidencia o probabilidad de padecer enfermedades inflamatorias y cáncer de colon. Se ha postulado que los linfocitos T reguladores (activados por butirato) bloquean a los linfocitos T proinflamatorios, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias responsables de la proliferación celular y la supervivencia celular, las dos características más importantes de las células cancerosas (Chen & Vitetta, 2018). El butirato puede ejercer también sus efectos anticancerígenos a través de la inhibición de múltiples vías de señalización, modulando al sistema inmune para ejercer un efecto anticancerígeno; por lo tanto, se ha postulado que el butirato puede producir una respuesta sinérgica de la vía de señalización inhibitoria y un efecto antiinflamatorio (Chen & Vitetta, 2018).

Hidratos de carbono y fibras dietarias no digeribles

Los carbohidratos son un grupo de macromoléculas compuestas principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno. La función biológica de estas macromoléculas se encuentra estrechamente ligada con su composición, estructura y propiedades fisicoquímicas. Químicamente, son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas (o moléculas que dan éstas como resultado de una hidrólisis) cuya estructura puede variar. Las formas más simples de estas moléculas son los monosacáridos, azúcares simples que pueden unirse entre sí generando estructuras más grandes y complejas como los disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los azúcares más simples, monosacáridos, se unen químicamente por medio de enlaces covalentes llamados

“glicosídicos”. Este tipo de uniones se clasifican y nombran según los carbonos que se vean involucrados en la unión, así como también por su geometría o disposición espacial. De este modo, se incrementa la variabilidad de polímeros posibles, dadas las distintas entidades moleculares que pueden existir según la naturaleza de los enlaces, así como también por la identidad de los monosacáridos constituyentes.

Los polisacáridos son sintetizados por los seres vivos cumpliendo distintas funciones según sus propiedades estructurales: la celulosa que forma parte de la pared celular de la célula vegetal, el glucógeno y almidón utilizados como reserva de energía en animales y vegetales respectivamente, o la quitina y glucanos que forman parte de la pared celular de células fúngicas. Muchos de estos polímeros se incorporan en la dieta. Sin embargo, el tamaño que poseen estas macromoléculas impide su absorción en su forma polimérica, por lo que los organismos que los consuman deben poseer enzimas para su digestión y fraccionamiento en monómeros. Estas enzimas son selectivas para un tipo de enlace en particular. En los seres humanos, se encuentra principalmente la enzima amilasa pudiendo encontrarse la isoforma salival y pancreática cuya capacidad se restringe a hidrolizar los enlaces del tipo alfa (α) formados entre los carbonos 1 y 4 de los monómeros de glucosa que componen el almidón y el glucógeno. Sin embargo, existen muchos oligo y polisacáridos de distintos orígenes cuyas uniones entre azúcares simples difieren a la de los ya mencionados. Como se indicó anteriormente, todos aquellos oligo y polisacáridos incapaces de ser digeridos por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal de los seres humanos constituyen la “fibra dietaria no digerible”. Entre estas moléculas se encuentran la celulosa, los fructooligosacáridos como la inulina, y otros varios polisacáridos provenientes de plantas, hongos y algas; algunos de ellos se describen a continuación: el glucogalactano kefiran, ciertos α -glucanos o dextranos y los β -glucanos.

Kefiran, dextrano y β -glucanos: composición y características

En este trabajo se propone utilizar como fibra a tres polisacáridos provenientes de fuentes naturales que se encuentran sub-aprovechadas. Por un lado, la biomasa excedente de gránulos de kefir de agua y de leche (inóculo para fermentaciones) y por otro lado, la crema de levaduras (subproducto de la industria cervecera). A partir de gránulos de kefir de leche y de agua se pueden obtener respectivamente el glucogalactano denominado “kefiran” y un α -glucano. A partir de crema de levaduras se puede obtener un β -glucano.

El **kefiran** es el polisacárido presente en los gránulos de kefir de leche y se encuentra constituyendo los mismos en aproximadamente un 9 % a 10 % del peso húmedo. Químicamente, es un **glucogalactano** altamente soluble en agua, compuesto en partes equivalentes por glucosa y galactosa con uniones glicosídicas de tipo α 1-4 en la cadena principal y β 1-6 en las ramificaciones, con un peso molecular superior a 10^6 Da (Piermaria *et al.*, 2008), sintetizado por un microorganismo presente en los gránulos: *Lactobacillus kefiranofaciens* (Hamet *et al.*, 2013). Dada su estructura, solubilidad y propiedades fisicoquímicas, se han propuesto diversas aplicaciones para este polisacárido, ya que presenta propiedades funcionales interesantes como la capacidad de formar criogeles (Piermaria *et al.*, 2008; Exarhopoulos *et al.*, 2022) y modificar significativamente las características reológicas de soluciones acuosas (Piermaria *et al.*, 2016, 2020), así como la posibilidad de formar películas comestibles (Piermaria *et al.*, 2009; 2011; 2015; Gagliarini *et al.*, 2019). También posee interesantes propiedades biológicas como antagonismo de virulencia de un patógeno intestinal

como *Bacillus cereus* (Medrano *et al.*, 2008, 2009), actividad inmunomoduladora (Vinderola *et al.*, 2006; Medrano *et al.*, 2010) y bifidogénica (Hamet *et al.*, 2013), y estimulación de la producción de ácidos orgánicos por parte de la microbiota intestinal en un sistema de fermentación *in vitro* (Medrano *et al.*, 2020).

Por otro lado, la matriz de los gránulos de kefir de agua se encuentra formada por un homopolisacárido insoluble en agua, compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces α 1-6, lineal, con un bajo porcentaje de ramificaciones α 1-3 (Fels *et al.*, 2018). Se lo clasifica como un **α -glucano** (que también se denomina **dextrano**) y es sintetizado por un microorganismo presente en los gránulos, *Lentilactobacillus hilgardii* (anteriormente *Lactobacillus hilgardii*) (Pidoux *et al.*, 1988; Coma *et al.*, 2019). Si bien las propiedades biológicas de este polímero han sido poco estudiadas a la fecha, se considera que es una molécula con posibilidades de ser utilizada como aditivo en alimentos funcionales (Freitas *et al.*, 2011). En general, los dextranos son reconocidos como moléculas bioactivas con potencial para ser consideradas prebióticas (Sarhini *et al.*, 2013; de Paiva *et al.*, 2016; Calatayud *et al.*, 2021). Recientemente, se ha demostrado que los polisacáridos producidos por cepas aisladas de kefir de agua, sintetizados por *Liquorilactobacillus satsumensis* (anteriormente *Lactobacillus satsumensis*) pueden favorecer el desarrollo de bacterias intestinales benéficas y la producción de ácidos orgánicos *in vitro* (Tan *et al.*, 2022). Con relación a la funcionalidad tecnológica del dextrano de gránulos de kefir de agua, sus propiedades incluyen la formación de películas (Coma *et al.*, 2019) y su uso como hidrocoloide en la industria panificadora (Hermann *et al.*, 2016), entre otras.

Los **β -glucanos** son polisacáridos constituidos por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos tipo β . Son frecuentes en paredes celulares fúngicas, tanto de hongos superiores como de levaduras; también se encuentran en la capa de aleurona y en el salvado de algunos cereales como la avena y el centeno. En el caso de los β -glucanos que se encuentran en las paredes de levaduras son: \sim 30-45 % β -1,3 glucano y \sim 5-10 % β -1,6 glucano, mientras que también puede encontrarse α -1,3 glucano (Pengkumsri *et al.*, 2017). Los β -glucanos tienen un peso molecular variable (1 a 30 kDa) y son en su mayoría insolubles en soluciones acuosas. Las propiedades tecnológicas de los β -glucanos aislados de paredes de levaduras han sido estudiadas por algunos autores, encontrando que tienen capacidad para formar películas biocompatibles (Peltzer *et al.*, 2018) y pueden actuar como sustituto de materia grasa en salsas y mayonesas (Thammakiti *et al.*, 2004; Rachwal *et al.*, 2020). Con respecto a su actividad biológica, se ha estudiado en modelos animales (Caruso *et al.*, 2020) y en algunos trabajos donde se evaluó su capacidad de favorecer bacterias intestinales benéficas en un modelo de fermentación *in vitro* utilizando materia fecal de origen humano (Chaikiang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020). La relevancia de encontrar aplicaciones para el excedente de crema de levaduras radica en que ésta es el segundo subproducto de la industria de elaboración de cerveza (Caruso *et al.*, 2020). En la Tabla 1 se resume la información relativa a estos tres polisacáridos con los que se propuso realizar el presente trabajo.

TABLA 1: Polisacáridos incluidos en el presente trabajo, composición de monómeros, enlaces y referencias bibliográficas.

Polisacárido	Composición	Enlaces	Referencias
glucogalactano (kefirán) (gránulos de kefir de leche)	galactosa y glucosa 1:1	α 1-4 y β 1-6	Kooiman, 1968; Piermaria et al., 2008.
α -glucano (dextrano) (gránulos de kefir de agua)	glucosa	α 1-6 y α 1,3	Pidoux et al., 1988; Fels et al., 2018.
β -glucanos (pared levaduras cereveceras)	glucosa	β 1-3 y β 1-6	Barsanti et al., 2011.

Fermentabilidad de los polisacáridos

Los polisacáridos descritos anteriormente y propuestos para su evaluación en el presente trabajo, comparten la característica de no poder ser degradados por las enzimas del tracto gastrointestinal de los seres humanos. Los enlaces glicosídicos que presentan y la falta de enzimas en el organismo capaces de hidrolizarlos, hacen que estas moléculas puedan llegar al intestino grueso intactas. Cuando la fibra dietaria que no ha sido digerida llega al intestino, entra en contacto con la microbiota intestinal, cuyos microorganismos son capaces de utilizarla como sustrato metabólico.

El principal proceso que llevan a cabo los microorganismos intestinales con estas moléculas es la fermentación anaeróbica. Como resultado de este proceso se generan ácido láctico y ácido acético los cuales, gracias al proceso de *cross-feeding* (Louis & Flint, 2017), son a su vez sustrato para la producción de otros ácidos grasos de cadena corta como el ácido propiónico y el ácido butírico. Estos ácidos tienen un efecto benéfico en la salud del hospedador, tanto en el ambiente intestinal como a nivel sistémico. Es importante señalar que no todos los carbohidratos no digeribles tienen actividad prebiótica. Para poder tener la cualidad de prebiótico se debe demostrar un beneficio para el consumidor (Holscher, 2017).

La capacidad de las fibras incluidas en este trabajo de ser fermentadas por la microbiota intestinal humana ha sido abordada en algunos estudios. Para el caso del glucogalactano kefirán, se ha demostrado que es capaz de estimular la producción de ácidos orgánicos por parte de la microbiota intestinal en un sistema de fermentación *in vitro* utilizando materia fecal de niños con dieta omnívora (Medrano *et al.*, 2020). La fermentabilidad del α -glucano de gránulos de kefir de agua no ha sido estudiada hasta el momento, sin embargo, se demostró que el α -glucano producido por una cepa de *L. satsumensis* aislada de kefir de agua puede favorecer el desarrollo de bacterias intestinales benéficas y la producción de ácidos orgánicos *in vitro* (Tan *et al.*, 2022). Con respecto a los β -glucanos de pared de levaduras, se ha estudiado recientemente su capacidad de favorecer bacterias intestinales benéficas en un modelo de fermentación *in vitro* utilizando materia fecal de origen humano (Chaikliang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

Microbiota y salud Intestinal

Se sabe que la microbiota intestinal es única e irreplicable entre individuos de una misma especie, siendo comparada con la huella dactilar o la información genética (Arumugam *et al.*, 2011). El proceso de colonización y establecimiento de la microbiota se va dando a lo largo de la vida de cada individuo. En los primeros estadios durante la vida fetal, se produce la primera

colonización al interior del colon del feto por parte de la microbiota intestinal materna, sin embargo, diversos factores como el modo de nacimiento y la lactancia son cruciales para el posterior desarrollo microbiano (Matamoros *et al.*, 2013; Collado *et al.*, 2016). Otros factores que pronto tienen influencia en el establecimiento de la microbiota son los hábitos de vida, el consumo de antibióticos y la dieta (Arumugam *et al.*, 2011; Conrad & Vlassov, 2015). A lo largo de los años de la vida del individuo la microbiota comienza a complejizarse gradualmente, siendo la alimentación de fundamental influencia sobre el perfil de microorganismos y su actividad metabólica.

La estrecha relación entre la microbiota y su hospedador adquiere una vital importancia en la prevención o generación de las patologías intestinales que se basan en alteraciones del equilibrio, tanto de las poblaciones microbianas como de sus metabolitos (*eubiosis-disbiosis*) (Gao *et al.*, 2015). Los estados de desequilibrio pueden llegar a desencadenar el desarrollo de distintas enfermedades, en las cuales se han descrito cambios en las poblaciones microbianas y -en algunos casos- se ha podido concluir acerca de los géneros benéficos y asociados a la prevención de ciertas patologías (Conrad & Vlassov, 2015; Gao *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018). En muchos casos se ha encontrado una estrecha relación entre el desarrollo de la enfermedad y la ausencia de ciertos *Taxa* bacterianos, como integrantes de la familia *Ruminococcaceae*, el género *Roseburia* y la especie *Clostridium butyricum*, microorganismos productores de butirato, donde su disminución conlleva a la aparición de neoplasias intestinales (Rezasoltani *et al.*, 2018).

Actividad biológica de los productos de fermentación

Diversos estudios han evidenciado que el consumo de fibra dietaria no digerible tiene un gran impacto en la microbiota intestinal, correlacionando en algunos casos con la capacidad de estimular ciertas poblaciones de bacterias productoras de butirato como representantes de los géneros *Roseburia* y *Faecalibacterium* (Scott *et al.*, 2014). La relevancia que posee este ácido orgánico es debida a su capacidad de ser utilizado como sustrato metabólico por los enterocitos y, además, su capacidad de inducir apoptosis en células tumorales (Donohoe *et al.*, 2013).

El mecanismo descrito para esta actividad antitumoral radica en el metabolismo acelerado que poseen las células tumorales. Estas últimas, poseen requerimientos energéticos que son principalmente respaldados por medio de rutas como la fermentación láctica; sin embargo, la presencia de butirato en estas células es capaz de inducir el uso de las mitocondrias para generar energía por medio de la ruta de la fosforilación oxidativa, ruta que, como consecuencia de una gran velocidad y tránsito a través de ella, genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno como ion superóxido o peróxido de hidrógeno, que dañan a la célula tumoral induciendo su muerte celular programada (Duncan *et al.*, 2004; Donohoe *et al.*, 2013). Por su parte, el ácido láctico ha sido propuesto como un factor preventivo de la generación de procesos inflamatorios, los cuales tendrían una gran influencia en las condiciones de desarrollo de pólipos intestinales (Iraporda *et al.*, 2015). Otros ácidos como el acético, isovalérico y valérico no poseen un papel como metabolitos protectores, sino que pueden llegar a aparecer en la materia fecal indicando desbalances en la microbiota, asociados a cáncer colorrectal (Weir *et al.*, 2013).

Si bien la producción de butirato por parte de la microbiota intestinal acarrea una serie de cambios benéficos para la salud del hospedador, estas respuestas no se encuentran generalizadas para todos los individuos dada la variabilidad interindividual en las especies y géneros que

componen la microbiota. Por otro lado, la naturaleza química de la fibra dietaria (su estructura, composición, tipos de uniones, etc.) determinan la respuesta de la microbiota, dada la capacidad de cada microorganismo de fermentar estos compuestos según su metabolismo particular. De esta manera, es posible plantear que cada una de las fibras puede tener respuestas y perfiles de ácidos orgánicos totalmente distintos para cada individuo. De esto surge que el modelo de fermentación *in vitro* que se utiliza en este trabajo esté diseñado empleando muestras de materia fecal provenientes de donantes individualizados, en lugar de hacer las fermentaciones utilizando *pools* de materia fecal (Aguirre *et al.*, 2014).

Respuesta individual de la microbiota intestinal

Por lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que cualquier intervención dietaria capaz de modular la microbiota de un individuo en favorecimiento de la producción de butirato, sería un modo de prevención y/o reversión de estadios tempranos de patologías inflamatorias intestinales. Siendo la microbiota intestinal un ecosistema irrepetible entre individuos, y conociendo que la respuesta de esta microbiota frente a la administración de una fibra fermentable está relacionada con las características fisicoquímicas del polímero, es de esperar que, frente a la administración de distintas fibras, la microbiota de un mismo individuo responda de manera diferencial, siendo alguna fibra más favorable que otra en cuanto a la producción de butirato. Aunque de momento los ensayos que involucran microbiota intestinal humana son *in vitro*, los trabajos científicos que proponen este tipo de “intervenciones dietarias personalizadas” van en aumento (Chen & Vitetta, 2018; Collins *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021; Gosh *et al.*, 2022). Estas propuestas hacen referencia a la posibilidad de estudiar el comportamiento de la microbiota de un individuo, con el objetivo de encontrar la fibra fermentable más beneficiosa en el sentido de la producción de ácidos grasos de cadena corta con un impacto en la salud de esa persona. En este sentido, en el presente trabajo se plantea un aporte a las investigaciones relacionadas con las intervenciones dietarias personalizadas, al tiempo que propone el uso de polisacáridos sub-aprovechados, provenientes de la industria alimentaria.

OBJETIVOS

Por lo antedicho, el presente trabajo se propuso como objetivo general:

Evaluar la respuesta de la microbiota intestinal de donantes con patologías intestinales de origen inflamatorio frente a la presencia de diferentes polisacáridos no digeribles.

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

1- Caracterizar los polisacáridos en cuanto a composición y peso molecular.

2- Evaluar la respuesta de la microbiota intestinal de donantes frente a la administración de los distintos polisacáridos en relación con la producción de ácidos orgánicos.

3- Evaluar in vitro la actividad biológica de los ácidos producidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE POLISACÁRIDOS

Para el desarrollo de este trabajo, se propuso trabajar con tres polisacáridos que presentan enlaces glicosídicos que, en principio, son no digeribles por las enzimas del tracto gastrointestinal humano:

- 1) **Glucogalactano** kefiran proveniente de gránulos de kefir de leche,
- 2) **α -glucano** (dextrano) proveniente de gránulos de kefir de agua,
- 3) **β -glucano** proveniente de paredes de levaduras cervecera.

3.1.1 Glucogalactano (kefiran)

El kefiran se obtuvo a partir de gránulos de kefir de leche de acuerdo con Rimada y Abraham (2003). Los gránulos CIDCA AGK1, conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en leche, fueron descongelados y cultivados en leche descremada estéril UHT (SanCor, Santa Fe, Argentina) al 10 % p/v, colándolos y enjuagándolos cada 48 hs para remover la leche fermentada y agregar leche fresca. Una vez alcanzada una biomasa de aproximadamente 100 g, los gránulos lavados y escurridos se colocaron en una proporción 10 % p/v en agua destilada y fueron disgregados mediante agitación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Luego de descender la temperatura se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se trató mediante agregado del equivalente a dos volúmenes de etanol frío y mantenimiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 hs para la precipitación del polisacárido. Esta mezcla fue centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado resultante fue resuspendido en agua destilada caliente para luego repetir la precipitación. Finalmente, el polímero resuspendido en el menor volumen posible de agua destilada caliente, se liofilizó en un Heto-Lab FD (San Francisco, USA). Mediante esta metodología se puede obtener un polímero con un grado de pureza superior al 99% sin proteínas ni restos de lactosa en su composición final (Rimada y Abraham, 2003).

3.1.2 α -glucano (dextrano)

La fracción de dextranos provenientes de los gránulos de kefir de agua se obtuvo de acuerdo con Fels *et al.* (2018). Para esto, 100 g de gránulos (provenientes del reservorio del PEAS, FCE, UNLP) previamente crecidos en agua de cloro adicionada con 10 % p/v de azúcar de mascabo (Ba-La-Ju, Misiones, Argentina), fueron escurridos y dispersados en 1 litro de solución alcalina, llevada a pH 10 con NaOH 1M. La dispersión se mantuvo en agitación durante 30 minutos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, a continuación, se neutralizó con HCl 1M y se centrifugó el extracto resultante a 10.000 x g durante 15 minutos. El precipitado fue resuspendido en etanol frío al 96 % y mantenido a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 hs. Luego, la solución resultante fue centrifugada a 10.000 x g durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió en agua destilada caliente para, posteriormente, ser liofilizado en el equipo antes mencionado.

3.1.3 β -glucano

Los β -glucanos de paredes de levaduras provenientes de la industria cervecera fueron purificados de acuerdo con Penkrumsri *et al.* (2017), utilizando crema de levaduras proveniente de una planta elaboradora de cerveza de la ciudad de La Plata (cervecería Dackel; cerveza estilo Golden Ale, levaduras Fermentis S04, Lesaffre, Bélgica; sin previa reutilización). Brevemente, los pasos seguidos para la extracción de β -glucanos, consistieron en: inducción de autólisis de

levaduras por incubación a pH 5 a 50 °C durante 48 hs y posterior incubación a 80 °C durante 15 minutos en agitación. Posteriormente, se lavó esta suspensión y se incubó nuevamente con NaOH 1 M a 80 °C durante 2 hs en agitación. A continuación, se centrifugó e incubó la mezcla en ácido acético 1 M durante 2 hs a 80 °C para luego lavar el extracto resultante y resuspenderlo. Finalmente, el extracto fue liofilizado.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

3.2.1 Determinación del peso molecular

El peso molecular del kefiran se determinó en el CIDCA mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando una columna de exclusión molecular asociada a un detector de índice de refracción. Para establecer la relación entre el tiempo de retención en la columna y el peso molecular se realizó una curva de calibración con patrones de dextrano de peso molecular conocido, en el rango de 97000 a 3800000, ALO-2770 (Phenomenex, Torrance, CA). Se utilizó una columna de filtración en gel OH-PAK SB-805HQ (SHODEX, Japón). El tren completo de HPLC fue conformado por un sistema automático de aspiración de muestra modelo 717 (Waters, Milford), un controlador modelo 600 (Waters, Milford) y un refractómetro diferencial, modelo 410 (Waters, Milford). Las muestras disueltas en agua fueron eluidas a temperatura ambiente utilizando para ello NaOH 0,1 M. El flujo se mantuvo constante a 0,95 mL/min (presión: 120-130 psi). Se inyectaron para cada corrida 50 µL de solución de polisacárido de concentración cercana a 0,5 g/L. Previo a la inyección, todas las muestras fueron filtradas a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore, San Pablo, Brasil).

La determinación de peso molecular de α -glucano y β -glucanos fue realizada en el CIHIDECAR (FCEyN, UBA, Ciudad Universitaria, CABA). Brevemente, se tomaron 5 mg de cada una de las muestras liofilizadas y se resuspendieron en 1 mL de solución de NaNO₃ 0,05 M y NaOH 0,1 M que contenía NaN₃ al 0,02 % p/v. La suspensión resultante se mantuvo en agitación durante 24 hs para luego centrifugarse y filtrarse con una membrana de 0,45 µm. La determinación del peso molecular de los polisacáridos se realizó mediante cromatografía de permeación en geles en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (GPC-HPLC). Se utilizó una bomba Shimadzu LC-20AT y un detector de índice de refracción Shimadzu RID^a10A. El análisis se realizó utilizando las columnas Polisep-GPC-P500 (300 x 7,8mm, rango 50-2000Kda) y Supelco TSK-GP4000PW (300 x 7,8 mm, rango 1-700 kDa) conectadas en serie. Como solvente de elución se utilizó una solución de NaNO₃ 0,05 M conteniendo 0,02% de NaN₃ y pH 11 (NaOH), preparada con agua de calidad HPLC. Se trabajó a flujo constante de 0,6 mL/min y a temperatura ambiente. El sistema se calibró usando dextransos como estándares cuyos topes de pico poseen los siguientes pesos moleculares: 745000, 410000, 134600, 53000 y 8000 g mol⁻¹. La curva de calibración, así como la determinación de los valores de Mp (peso molecular en el máximo del pico), Mn (peso molecular promedio numérico), Mw (peso molecular promedio pesado) y polidispersión (Mw/Mn) se realizó utilizando el programa *LC Solution GPC software* (Shimadzu).

3.2.2 Determinación cualitativa de la composición química: cromatografía en capa fina

Para determinar la composición química, los polisacáridos se hidrolizaron con HCl 1,25 N durante 1 hora en baño de agua a 100 °C y se efectuó una cromatografía en capa fina (TLC) (Zweig y Sherma, 1978). Para ello, las soluciones hidrolizadas en una concentración de 5 g/L se sembraron en placas de Sílica gel G (Merck D-64271, Alemania) previamente activadas

(1 min en estufa a 100 °C). La siembra se realizó junto con patrones de glucosa y galactosa (0,5 % p/v en solución de etanol-agua 50 % v/v) utilizando una micropipeta (DragonLab, Beijing, China), colocando 1,5-2 μ L de cada muestra en un extremo de la placa, separadas entre sí por una distancia de 0,5 cm.

Una vez concluida la siembra, las placas se colocaron en un recipiente cerrado conteniendo el solvente de corrida con la atmósfera saturada en el mismo. La fase móvil utilizada fue una mezcla de ácido acético: éter etílico: agua (9:6:1 v/v/v). Se permitió el avance de fase móvil hasta una distancia de 2 cm de la parte superior de las placas, que se retiraron y se secaron. La corrida se desarrolló en campana de extracción de gases (Figura 1).

Luego de colocarse con la solución de revelado durante 1 minuto, se dejó evaporar el solvente y las placas se colocaron durante 5 minutos en estufa a 100 °C para permitir la visualización de los hidratos de carbono.

Solución de revelado (~60 ml)

- 10 mL de solución etanólica de α -naftol 15 % p/v
- 6,5 mL de ácido sulfúrico al 97 %
- 40 mL de etanol
- 4 mL de agua destilada

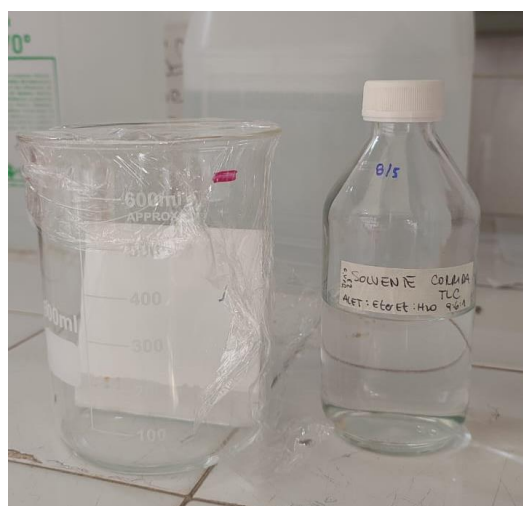


Figura 1: Placa de sílica gel para TLC sembrada e incubada con la fase móvil en campana de extracción de gases.

3.2.3 Determinación de proteínas: método de Bradford

Para determinar la ausencia de proteínas en los extractos obtenidos en el punto 1, se empleó la metodología de Bradford. Para esto, se adicionaron 50 μ L de los polisacáridos en suspensión en tubos de hemólisis a los cuales se les agregaron 1 mL de reactivo de Bradford junto con 50 μ L de NaOH 1 M. Asimismo, se realizó una curva de calibración utilizando como patrón soluciones de albúmina bovina (Sigma, St Louis, USA) en concentraciones comprendidas en un rango de 0,1-0,75 μ g/mL (Figura 2). Los tubos conteniendo patrones y muestras se agitaron e incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Metrolab, Argentina). Las diferentes concentraciones proteicas de la curva de calibración como las muestras se analizaron por duplicado.

Reactivo de Bradford

- 100 mg de Serva Blue G (Serva, Westbury, NY) o Coomassie Brilliant Blue G-250
- 100 mL de ácido fosfórico 85 % p/v
- 50 mL de etanol 95 % v/v
- Se lleva a volumen final 1 L con el agregado de agua destilada fría.

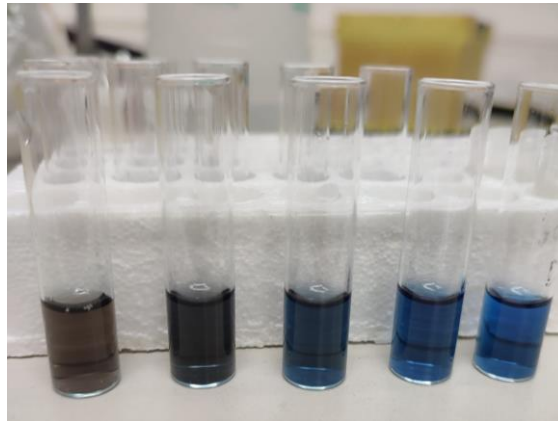


Figura 2: Reacción de Bradford para soluciones patrón de albumina bovina para calibración del método. De izquierda a derecha, las soluciones contenían 0; 0,10; 0,25; 0,50 y 0,75 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.4 Cuantificación de carbohidratos: método de la antrona

Los carbohidratos presentes en los extractos fueron cuantificados por medio del método de la antrona. Para esto, se preparó la solución *stock* de ácido sulfúrico 66 % v/v mediante la disolución de 660 mL de este ácido en 340 mL de agua con agitación y enfriamiento externo. A esta solución se le adicionaron 0,5 gramos de reactivo de antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno) (Biopack, Argentina) mientras se mantenía la mezcla a 80-90 °C. Asimismo, se prepararon soluciones patrones de glucosa en concentraciones de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$. En los tubos se colocaron 0,2 mL de la muestra a evaluar o las soluciones de concentración conocida destinadas a generar la curva de calibración y se adicionaron 2 mL del reactivo de antrona. Se agitó cada tubo por inversión y se incubaron en un baño de agua a ebullición durante 15 minutos para que desarrolle la reacción. A continuación, se enfriaron a temperatura ambiente en un baño de agua y se dejaron reposar durante 20 minutos en oscuridad. Luego, se procedió a medir la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro (Metrolab, Argentina). La coloración resultante en los tubos correspondientes a la curva de calibración se muestra en la Figura 3.

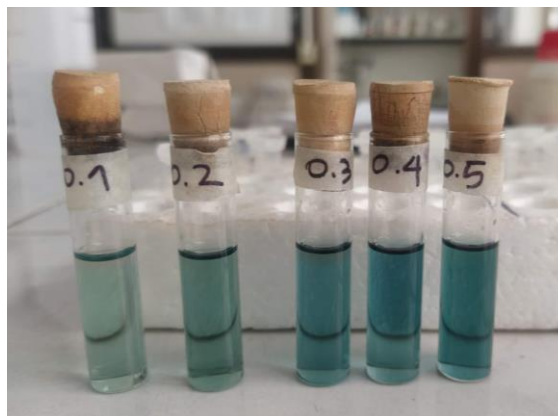


Figura 3: Desarrollo de color en tubos de concentración creciente de glucosa durante la cuantificación de azúcares por el método de la antrona. En cada tubo, las concentraciones están expresadas en g/L.

3.3- DIGESTIBILIDAD DE LAS FIBRAS: SIMULACIÓN *in vitro* DEL PASAJE POR EL TRACTO GASTRO INTESTINAL

La simulación del pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI) se efectuó de acuerdo con el método consensado del protocolo INFOGEST (Brodtkorb *et al.*, 2019).

Primeramente, se procedió a preparar las 3 soluciones empleadas para esta simulación: solución salival (SS), solución gástrica (SG) y solución intestinal (SI), llevando cada una al pH correspondiente (Tabla 2). Las soluciones se esterilizaron en autoclave. Las enzimas fueron adicionadas en el momento de la ejecución de cada ensayo.

TABLA 2: Composición de las soluciones utilizadas en la simulación por el pasaje TGI.

Reactivo	Solución Salival (mM)	Solución Gástrica (mM)	Solución Intestinal (mM)
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	1,35	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,15	0,12	0,33
NH ₄ (CO ₃) ₂	0,06	0,5	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5	0,15	0,6
HCl	1,1	15,6	8,4
pH final	7	3	7

Para efectuar la simulación se inició incubando 1 g de cada una de las fibras junto con 2 mL de SS con el agregado de 150 U/mL de α -amilasa (7 mg/mL) y se incubó durante 2 minutos a 37 °C. Posteriormente, a los tubos anteriores se adicionaron 2 mL de SG junto con el equivalente a 2000 U/mL de pepsina para luego incubar estos extractos durante 2 hs a 37 °C. Pasado este tiempo, en cada tubo se adicionaron 4 mL de SI junto a 134 mg de pancreatina y el equivalente a 20 mM de sales biliares. Estos tubos finalmente volvieron a incubarse a 37 °C durante 2 hs. En todos los casos, se midió el pH de las muestras tras cada agregado de solución verificando que el mismo sea el adecuado y llevando al pH correspondiente de no ser así. Todas las enzimas fueron provistas por Sigma (St. Louis, USA).

Luego del tratamiento con la solución intestinal, se procedió a llevar las dispersiones al frío para finalizar la reacción enzimática. Posteriormente, se centrifugó a 6400 x g durante 10 minutos y los precipitados y sobrenadantes fueron separados y conservados a -20 °C para las determinaciones posteriores.

Asimismo, se verificó la ausencia de degradación de los polisacáridos mediante TLC (ítem 2.2). En este caso, en el punto de siembra se colocó el sobrenadante de cada uno de los tubos conteniendo los polisacáridos luego de haber sido sometidos a la acción de las enzimas. Se utilizó como control cada fibra suspendida en agua previa al tratamiento TGI.

3.4 FERMENTABILIDAD DE LOS POLISACÁRIDOS *in vitro*

3.4.1 Preparación del medio de cultivo formulado

Para llevar a cabo los experimentos de fermentación, se preparó inicialmente un medio de cultivo base, el cual se formuló según lo descrito por Al-Tamimi *et al.* (2006), con modificaciones. Para esto, se pesaron los componentes sólidos (Tabla 3) y se solubilizaron en agua destilada (1000 mL). Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez enfriado, se adicionaron: 1 mL/L de solución stock de hemina al 0,5 % p/v, 10 µg/mL de solución de Vitamina K comercial al 0,1 % p/v y 0,5 g/L de cisteína acidulada con HCl. El pH se llevó a 7,5.

TABLA 3: Composición del medio de cultivo base formulado según Al-Tamimi *et al.* (2006).

Reactivo	Concentración (g/L)
Peptona de Carne	2
Extracto de Levadura	2
NaHCO ₃	2
Bilis de Buey	0,5
NaCl	0,1
K ₂ HPO ₄	0,04
MgSO ₄	0,01
CaCl(H ₂ O)	0,006

A partir de este medio basal, se prepararon otros medios, a los cuales se les agregaron los polisacáridos en evaluación en una concentración final de 300 mg/L. Se incluyó un control con glucosa en la misma concentración y un control sin el agregado de azúcares.

3.4.2. Fermentación de los polisacáridos *in vitro* por bacterias intestinales

Se utilizaron como inóculo muestras fecales de pacientes voluntarios afectados por patologías intestinales (n=4) más un control sin patología, que no habían recibido tratamiento con antibióticos en los últimos 6 meses previos a la realización del ensayo y que habían llevado a cabo una dieta omnívora (excepto un donante con dieta vegetariana). Las muestras se entregaron dentro de las 4 horas posteriores a la deposición junto con una nota de consentimiento informado y fueron inmediatamente refrigeradas en condiciones de anaerobiosis. Los barros fecales para el inóculo se prepararon a partir de una dilución 1/10 de las muestras de materia fecal en el medio de cultivo base (Al-Tamimi *et al.*, 2006) y fueron utilizados inmediatamente para los ensayos de fermentación.

Los medios de cultivo conteniendo las fibras en una concentración 300 mg/L, así como el control con glucosa y el control sin azúcar, fueron inoculados con los barros fecales en una dilución 1/10 y se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis durante 24 y 48 hs (Figura 4). Transcurridos dichos tiempos, se tomaron alícuotas para la determinación de los ácidos orgánicos producidos. Para esto, los medios fermentados fueron centrifugados, tomando el sobrenadante para el análisis posterior del perfil de ácidos mediante cromatografía gaseosa.

Simultáneamente, se verificó el crecimiento microbiano mediante observación directa de la turbidez, y se monitoreó la presencia de ácidos mediante la evaluación del pH mediante la utilización de tiras reactivas (Merk, Alemania).



Figura 4: Medios de cultivo conteniendo las fibras, con el agregado de los barros fecales preparados para ser incubados en las jarras de anaerobiosis. Las fermentaciones se realizaron por duplicado.

3.5 CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE FERMENTACION (ÁCIDOS ORGÁNICOS) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA

Tras el experimento de fermentación *in vitro*, se tomaron alícuotas de 1 mL de los sobrenadantes de centrifugación correspondientes a los 5 individuos con las distintas fuentes de fibra a los tiempos de 24 horas y 48 horas de la inoculación para luego ser centrifugadas y filtradas (membranas de PVDF, 0,45 μm de diámetro de poro, Hadalwings). Asimismo, fueron incluidas en el análisis las muestras de materia fecal de cada individuo.

Tanto los sobrenadantes de fermentación como las muestras de materia fecal fueron utilizadas para cuantificar los ácidos orgánicos presentes mediante cromatografía gaseosa. Para ello, se utilizó un cromatógrafo gaseoso (Agilent Technologies, Modelo 7A90A, USA) asociado a una columna DBFATWAX UI. 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . Las condiciones operativas de las corridas fueron las siguientes: *Inlet 280 °C; Split 50:1, flow 1 mL/min; Oven rampa: 120 °C 2 min -5 °C/min hasta 140 °C.*

Para llevar a cabo las determinaciones, se comenzó con la realización de una serie de calibrados con soluciones patrones de los ácidos buscados: acético, propiónico y butírico a las concentraciones de 5 mM, 7,5 mM y 10 mM (Sigma Aldrich, USA). También se incluyeron patrones de ácidos fórmico, isobutírico, valérico, isovalérico, hexanoico y heptanoico.

A partir de los resultados correspondientes a los patrones se construyeron las curvas de calibración ajustando los resultados experimentales de área de picos en función de la concentración a una recta mediante regresión lineal.

Utilizando las curvas de calibración y en función de los picos correspondientes a cada muestra se calcularon las concentraciones de cada uno de los ácidos evaluados en función del individuo, el polisacárido y el tiempo de fermentación.

3.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

3.6.1- Células en cultivo

Células de la línea Caco-2/TC7 provenientes de un adenocarcinoma de colon se cultivaron en placas de 48 fosas en DMEM (Dulbecco Modifeied Eagle Medium) suplementado con aminoácidos no esenciales, antibiótico, antimicótico y suero fetal bovino (20 % v/v). Se cultivaron en estufa a 37 °C con atmósfera de 95 % de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 2 días. Los ensayos se realizaron con células al 50 % de confluencia, condición alcanzada a las 72 hs de acuerdo con las condiciones de cultivo utilizadas (recuento de células al momento de inocular la placa: 2 10⁵ células/mL).

3.6.2 Ensayos de actividad biológica en células

Una vez realizados los ensayos de fermentación *in vitro* (ítem 4) y cuantificados los ácidos orgánicos presentes en cada condición, se seleccionó para cada medio de cultivo y para cada individuo, la condición que presentó la mayor concentración de ácido butírico. Luego, utilizando el medio de cultivo basal de las células (DMEM, sin el agregado de suero), y utilizando ácidos orgánicos patrón (Sigma, USA) se simuló estas concentraciones de manera tal de emular los resultados obtenidos en las fermentaciones. Dichas soluciones se neutralizaron con NaOH 0,1 M y se esterilizaron por filtración (utilizando filtros de 0,33 µm diámetro de poro, Millipore). Luego, las células TC7 al 50 % de confluencia fueron incubadas con estas soluciones durante 48 hs en estufa a 37 °C con atmósfera de 95 % de CO₂. Se incluyeron controles sin tratamiento (DMEM) y un control de daño inducido por el ácido butírico en concentraciones 2,5 mM, 5 mM y 10 mM. También, se reservaron fosas para incluir un control de daño 100% (tritón 0,1 % v/v) al momento del revelado del ensayo. Todas las condiciones fueron realizadas en duplicado.

Transcurridas las 48 hs, se retiró el sobrenadante, y las células se lavaron cuidadosamente con PBS estéril (KH₂PO₄ 0,144 g/L; Na₂HPO₄ 0,795 g/L; NaCl 9 g/L; pH: 7-7,4) y se realizaron las determinaciones de viabilidad mediante tinción de las células dañadas con azul tripán y cuantificación de la actividad mitocondrial, según se detalla a continuación.

3.6.3 Determinación de la viabilidad mediante tinción con azul tripán

El azul tripán es un colorante al que las células viables no permiten ingresar. Por lo tanto, tiñe únicamente células no viables. Observando en microscopio óptico (mediante recuento directo por campo microscópico, o mediante el uso de cámara de recuento tipo Neubauer) se pueden cuantificar el número de células viables y no viables en una muestra.

A cada fosa, se adicionaron 250 µL de una solución de azul tripán 0,1 % y se realizó de manera inmediata el conteo de células dañadas en un microscopio invertido (Leica Binocular Modelo DM IL LED, Alemania). Se tomaron fotografías con aumento de 40X en 3 campos al azar por fosa, para luego contar el número de células no viables y establecer un porcentaje promedio. En la Figura 5 se puede observar el aspecto de las fosas teñidas con el colorante.

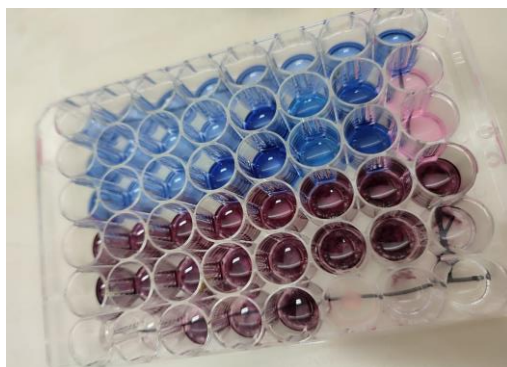


Figura 5: Placa de 48 fosas (wells), con fosas teñidas con azul tripán en la parte superior. En la parte inferior, se observan las fosas incubadas con MTT y luego reveladas con dimetilsulfóxido (DMSO).

3.6.4 Determinación de la viabilidad celular por el método MTT

Este ensayo se basa en la conversión de la sal amarilla MTT –3 -(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium) en un formazan insoluble color violeta debido a la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial. Luego de incubar las células con concentraciones de ácidos de acuerdo con lo descrito en 6b, las células se lavaron cuidadosamente con PBS y se incubaron con 250 μ L de una solución conteniendo 0,5 μ g/mL de MTT (Sigma St. Louis, USA) en PBS durante 4 hs a 37 °C. Luego, el sobrenadante fue retirado y el colorante fue removido con DMSO (dimetilsulfóxido, Anedra) (Figura 5). Se midió la absorbancia a 550 nm (Abs_{550}) en un lector de placas (Sinergy HT. Biotek/Sinergy). El porcentaje de actividad remanente fue calculado como:

$$\% \text{ actividad mitocondrial} = 100 \times (Abs_{550 \text{ nm}} / Abs_{550 \text{ nm C}})$$

Donde $Abs_{550\text{nm}}$ es la absorbancia de las células tratadas y $Abs_{550\text{nmC}}$ es la absorbancia de los controles sin tratamiento.

ESTADÍSTICA

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba T de Student (Excel, Microsoft).

SALVAGUARDA ÉTICA

Las actividades que se plantearon no atentaron contra las normas bioéticas nacionales e internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Se trabajó respetando la Ley Nacional 26.529 “Derechos del Paciente” y Ley Nacional 25.326 “Protección de los Datos Personales”. Todas las muestras de materia fecal fueron procesadas luego de recibir la nota de consentimiento informado por parte del donante. El diseño experimental que se planteó en este proyecto cuenta con el aval del Comité Consultivo Central de Bioética de la Universidad Nacional de La Plata (Diciembre 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

A partir de las metodologías de obtención y purificación empleadas, se pudieron obtener extractos de los tres polisacáridos (kefiran, dextrano y β -glucano) que fueron liofilizados (Figura 6). En primer lugar, se realizó la cuantificación de hidratos de carbono totales, se verificó la ausencia de monosacáridos mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se evaluó el contenido de proteínas utilizando el método de Bradford. Con los resultados obtenidos, se calculó el rendimiento del proceso de extracción y purificación para cada polisacárido. Luego, se procedió a la caracterización de cada polisacáridos mediante la determinación de la composición de azúcares (hidrólisis y TLC) y peso molecular (HPLC).



Figura 6: Aspecto de los extractos liofilizados conteniendo los polisacáridos purificados, de izquierda a derecha: kefiran, β -glucanos y dextrano.

4.1.1 - Cuantificación de carbohidratos por el método de la antrona

Los polisacáridos resuspendidos en agua (kefiran) o en NaOH 1M (β -glucanos y dextrano) fueron cuantificados mediante el método de la antrona. En la Figura 7 se presenta la curva de calibración correspondiente.

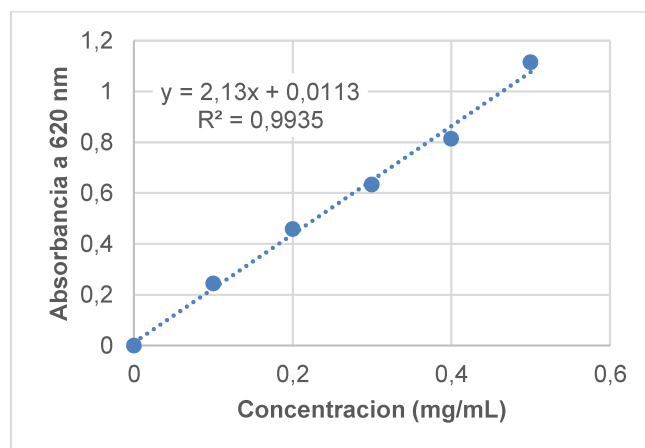


Figura 7: Absorbancia a 620 nm vs la concentración de glucosa en mg/mL, correspondiente a la curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos por el método de la antrona. Se incluyó la ecuación de la recta de ajuste de los puntos experimentales y el coeficiente de correlación, R^2 , del análisis.

De acuerdo con la cuantificación de azúcares presentes en los extractos liofilizados, se estimó que el peso seco correspondió prácticamente en su totalidad a carbohidratos.

Para comprobar que todos los azúcares cuantificados por el método de la antrona fuesen polisacáridos, se verificó la ausencia de azúcares pequeños mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Figura 8). Como puede observarse en la fotografía correspondiente, no se detectaron compuestos con un desplazamiento similar al del patrón de glucosa ni al de galactosa, evidenciándose la mayor tinción en el punto de siembra. Por lo tanto, puede concluirse que el contenido de azúcares determinado por el método de la antrona corresponde en su totalidad a polisacáridos.



Figura 8: Imagen de placa de cromatografía en capa fina (TCL) con patrones (glucosa y galactosa) y extractos de los polisacáridos evaluados. De derecha a izquierda: Calle 1: Glucosa; calle 2: Galactosa; calle 3: β -glucanos; calle 4: dextrano; Calle 5: kefiran.

4.1.2 - Contenido de proteínas

Se cuantificaron las proteínas presentes en los extractos liofilizados mediante el método de Bradford. Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina comercial como patrón, y los puntos de absorbancia experimentales en función de la concentración se ajustaron a una recta (Figura 9).

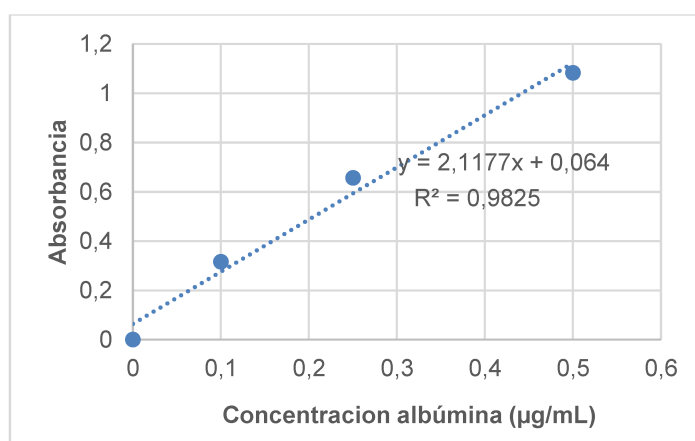


Figura 9: Absorbancia a 590 nm vs la concentración de albumina, en $\mu\text{g/mL}$, correspondiente a la curva de calibración de proteínas para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Se presenta la ecuación de la recta de ajuste de los puntos experimentales y el coeficiente de correlación, y el R^2 .

A partir de la curva de calibración, se calculó el contenido de proteínas presentes en cada uno de los extractos liofilizados, encontrando valores menores a 2 % p/p en todos ellos. Estos valores están en concordancia con datos bibliográficos para las obtenciones de kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche (Piermaria 2008; Medrano 2009), o de β -glucanos y dextrano encontrados por otros autores utilizando fuentes de fibra y metodologías de extracción similares (Penkrumski *et al.*, 2017; Fels *et al.*, 2018, respectivamente).

4.1.3 - Cálculo del rendimiento

Si bien en los extractos liofilizados no se cuantificaron lípidos ni minerales, se espera que los mismos no contengan valores significativos de estos componentes de acuerdo con las características de las matrices de las cuales provienen, las metodologías de purificación utilizadas y lo encontrado por otros autores para el kefirán (Rimada y Abraham, 2003), el dextrano (Fels *et al.*, 2018) y los β -glucanos (Penkrumski *et al.* 2017). Considerando los resultados antes descritos respecto del contenido de carbohidratos, el bajo contenido de proteínas y la ausencia de azúcares libres, para la utilización en el resto del trabajo se consideró que los extractos estaban compuestos en su totalidad de polisacáridos.

Para calcular el rendimiento de extracción de cada polisacárido a partir de la fuente de obtención, se tuvo en cuenta la masa inicial de gránulos o el volumen de crema de levaduras, el volumen final del extracto concluido el proceso de purificación, la masa seca *post* liofilización y la cuantificación de carbohidratos por el método de la antrona. De acuerdo con esto, se encontró que el rendimiento del proceso de extracción y purificación de kefirán a partir de gránulos de kéfir de leche húmedos y escurridos fue del 6 % p/p; el de dextrano a partir de gránulos de kéfir de agua húmedos y escurridos fue del 9 % p/p y el correspondiente a los β -glucanos a partir de crema de levaduras fue del 0,8 % p/v.

4.1.4 - Peso molecular de los polisacáridos

El peso molecular del kefirán se determinó mediante HPLC de permeación en gel. En la Figura 10 se muestra un cromatograma en el que puede observarse un solo pico con un tiempo de retención de 8 min, correspondiente a una única distribución de peso molecular. Este polisacárido eluyó de la columna en menor tiempo que el del patrón de dextrano de mayor peso molecular utilizado, indicando que posee un mayor tamaño efectivo en solución. A pesar de que no se puede determinar un valor exacto de peso molecular debido a que es necesaria una extrapolación en la curva de calibración empleada (porque el tiempo de retención del kefirán fue menor que el del patrón de peso molecular más alto), se le puede asignar un peso molecular mayor a 4×10^6 Da.

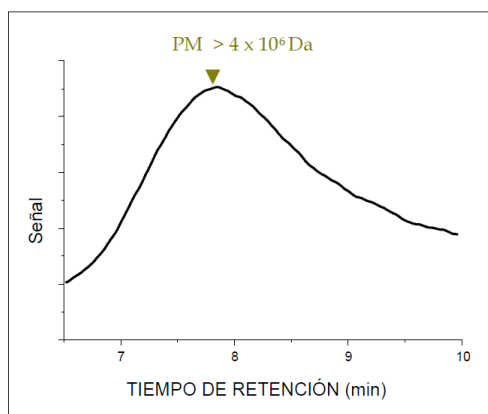


Figura 10: Cromatograma correspondiente a la corrida por HPLC de exclusión molecular del kefiran. Señal (en unidades arbitrarias) en función del tiempo de retención de la molécula en la columna.

De igual modo que para el anterior, el peso molecular del dextrano y de los β -glucanos se determinó por HPLC de exclusión molecular, utilizando una columna diferente. En cuanto a las muestras de dextrano, pudo observarse un pico con un tiempo de retención de 17,5 min que corresponde a peso molecular elevado, de aproximadamente $1,9 \times 10^7$ Da (Figura 11).

Muestra: Dextrano

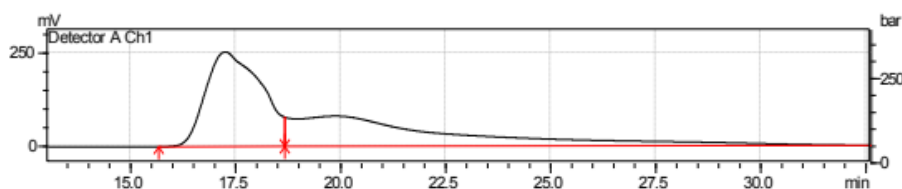


Figura 11: Cromatograma obtenido por HPLC de permeación en gel correspondiente al dextrano fracción soluble en NaOH 0,1 M. Se observa un pico a los 17.5 min.

Los β -glucanos presentaron dos picos, con tiempos de retención de 22 min y 24 min, que corresponden a pesos moleculares de $5,3 \times 10^6$ Da y de $1,9 \times 10^6$ Da (Figura 12). Dado que las paredes de levaduras contienen dos tipos de β -glucanos (β 1-3 y β 1-6) y un α 1-3 glucano, con un peso molecular comprendido entre 1 y 30 kDa (Penkrumski *et al.* 2017), es probable que el extracto obtenido al final de la extracción contenga los dos polisacáridos.

Muestra: Glucano A

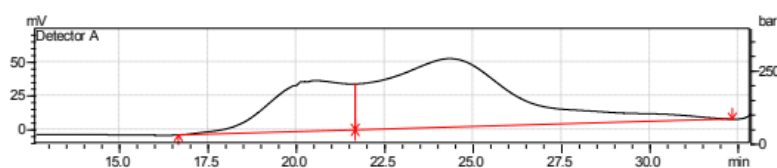


Figura 12: Cromatograma obtenido por HPLC de permeación en gel correspondiente a β -glucanos. Pueden observarse dos picos en tiempos de retención de 22 min y un pico mayor a los 24 min.

4.1.5 - Composición de azúcares

Respecto a la composición química de los polisacáridos, los productos de hidrólisis fueron sembrados y corridos en una placa para cromatografía de capa fina (TLC) junto con patrones de glucosa, y galactosa (Figura 13). Las cromatografías se realizaron por separado, a medida que se iban obteniendo los extractos.

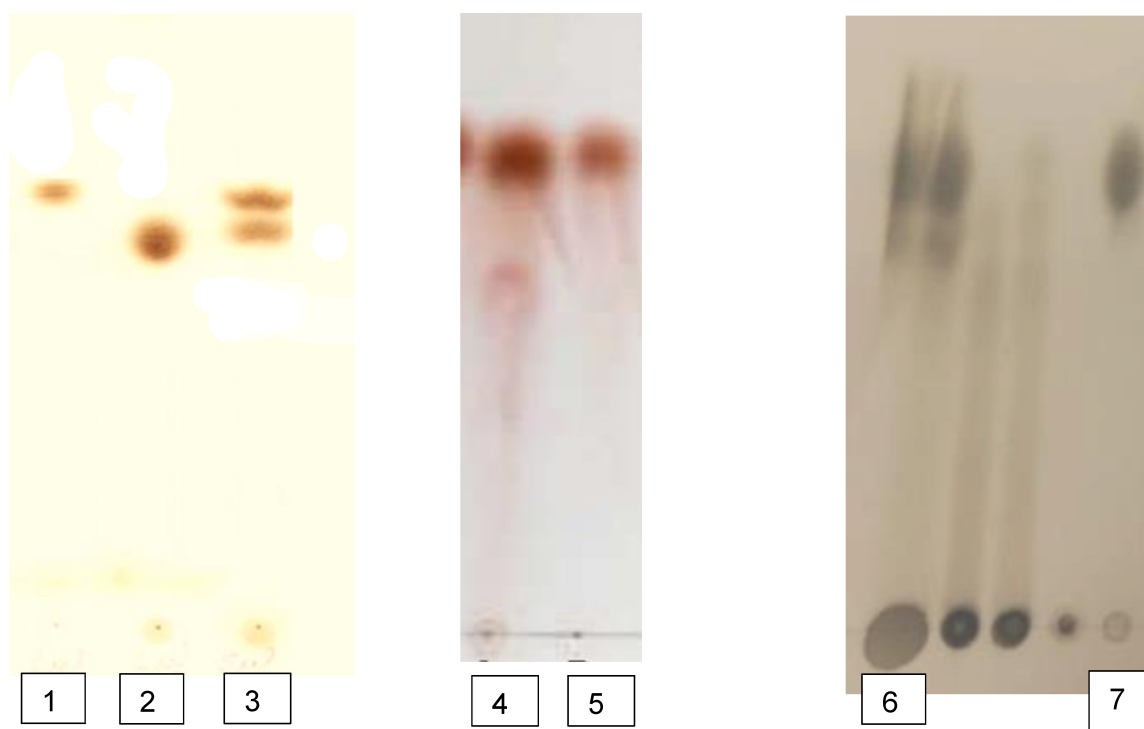


Figura 13: Resultados de cromatografía en capa fina de las corridas de los polisacáridos hidrolizados junto a los patrones de sus monómeros constituyentes. En la imagen A: calle 1: galactosa; calle 2: glucosa; calle 3 kefiran hidrolizado; Imagen B: calle 4: dextrano hidrolizado; calle 5: glucosa. Imagen C: calle 6: β -glucanos hidrolizados (hidrólisis incompleta); calle 7: glucosa.

Los resultados obtenidos a partir de las TLC de los productos de hidrólisis están en concordancia con lo encontrado por otros autores para el kefiran (Piermaria, 2008), los β -glucanos (Miller *et al.*, 2018) y el dextrano (Iraporda, 2010).

4.2 Simulación del pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI)

Los polisacáridos obtenidos fueron sometidos a la simulación del pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI). Para esto, se tomó 1 g de cada uno y se le adicionaron sucesivamente volúmenes de 2 mL, 4 mL y 6 mL de las soluciones de simulación salival, gástrica e intestinal, respectivamente. Las muestras a 37 °C en agitación constante se mantuvieron durante 2 minutos para la solución salival y 2 hs luego de los agregados de cada una de las soluciones, gástrica e intestinal. Finalizada la simulación, las enzimas se inactivaron mediante refrigeración.

Luego de este tratamiento, se procedió a verificar la ausencia de degradación e integridad de estos polisacáridos por medio de cromatografía en capa fina (TLC). Para ello, se sembraron 1,5 a 2 μ L de cada extracto post TGI junto con dispersiones de los polisacáridos sin tratamiento TGI, para utilizarlas como control y los monosacáridos glucosa y galactosa.

En este ensayo pudo observarse que los polisacáridos no migraron por la placa cromatográfica, quedando en el punto de siembra, coincidiendo con los resultados mostrados previamente en la Figura 8. Con respecto a las calles conteniendo los sobrenadantes de la aplicación de la simulación gastrointestinal, en la placa se observaron desplazamientos inespecíficos, pero no se evidenció ninguna mancha con desplazamiento equivalente a los patrones de glucosa o galactosa. Probablemente, dada la complejidad del sistema, haya algunas moléculas que se fragmentan y desplazan tiñéndose inespecíficamente. Aunque la ausencia de hidrólisis de los polisacáridos estudiados debe ser confirmada mediante otra metodología como HPLC, la evaluación mediante TLC como primera aproximación permite concluir que polisacáridos no pueden ser degradados por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal.

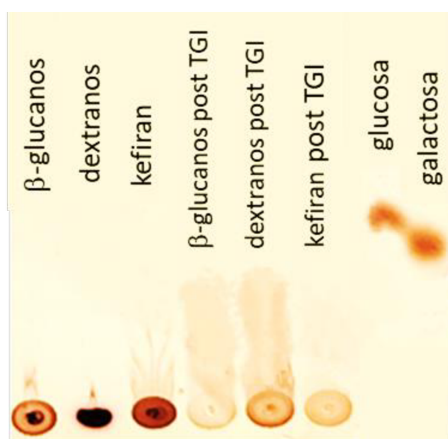


Figura 14: Imagen de placa TLC. De izquierda a derecha, las primeras tres calles corresponden a los extractos de las fibras purificadas, las siguientes tres a las correspondientes fibras luego de la simulación de pasaje por el TGI y las últimas dos corresponden a los monosacáridos glucosa y galactosa.

4.3. Fermentación *in vitro*

Con el fin de evaluar la capacidad de los polisacáridos de servir como sustrato fermentable para las bacterias presentes en la microbiota intestinal humana, con la consecuente producción de ácidos orgánicos, se utilizó un modelo de fermentación *in vitro*. Se trabajó con muestras de materia fecal provenientes de 4 donantes con distintas patologías intestinales de origen inflamatorio. Se utilizó como control una muestra de materia fecal de un individuo sin patología. La materia fecal de los donantes fue recibida junto con una nota de consentimiento informado y una breve encuesta sobre hábitos y patologías. Los datos de las encuestas se pueden observar en la tabla 4.

TABLA 4: Datos recabados en las encuestas entregadas por los individuos (n=5) incluidos en el presente estudio. CRC: cáncer colorrectal; CU: colitis ulcerosa; PCU: probable colitis ulcerosa.

	Individuo 1	Individuo 2	Individuo 3	Individuo 4	Individuo 5
Edad	43	51	40	48	46
Dieta	Omnívora	Omnívora	Vegetariana	Omnívora	Omnívora
Fuma	Si	Si	No	No	No
Deporte	Si	Si	Si	No	No
Patología	No posee	Pólipos	CRC	CU	PCU

La materia fecal fue procesada inmediatamente en el laboratorio, a fin de conservar la viabilidad de los microorganismos. Se realizó una dilución 1/10 en medio Al-Tamimi, dispersión que se denominó “barro fecal”, con la que se procedió a inocular los medios de cultivo preparados. Estos medios consistieron en medio Al-Tamimi adicionado con los distintos polisacáridos (kefiran, dextrano y β -glucanos en una concentración 300 mg/L), un control con glucosa (300 mg/L) y un control sin azúcar. El inoculo del barro fecal en los medios fue de 1/10 (Figura 15).

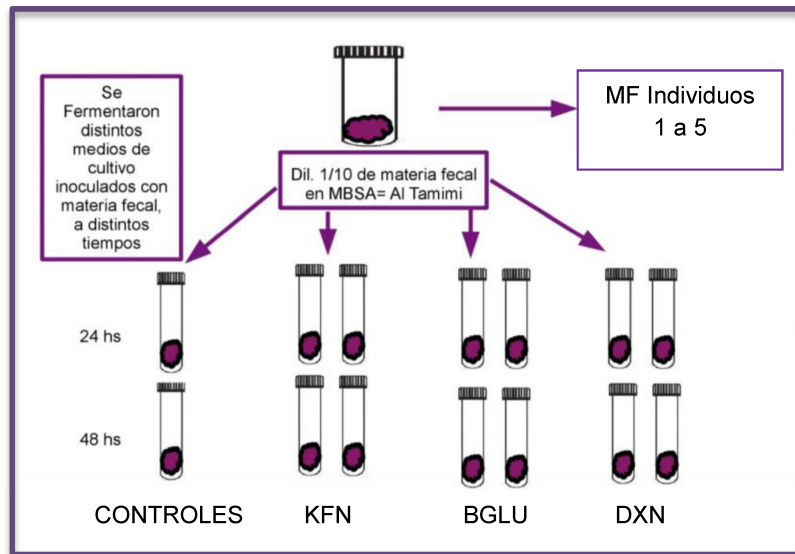


Figura 15: Esquema de trabajo (adaptado de Pastor, 2015). MBSA: medio base sin azúcar; MF: materia fecal; KFN: kefiran; DXN: dextrano; BGLU: β -glucanos.

Los medios de cultivo así inoculados se colocaron en jarras de anaerobiosis, con atmosfera de CO_2 y ambiente reductor, y se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 hs (Figura 16).



Figura 16: Incubación de las muestras en las jarras de anaerobiosis, preparadas en cabina de seguridad biológica, listas para colocar en la estufa a 37 °C.

4.3.1 Acidificación del medio de fermentación

Finalizado el período de incubación, se comprobó el desarrollo microbiano que generó turbidez y se evaluó el pH mediante tiras reactivas. En todos los casos, a las 24 hs, se observó desarrollo microbiano y se produjo la acidificación del medio. En la Figura 17 se presentan los valores de pH en función del tiempo de cada muestra.

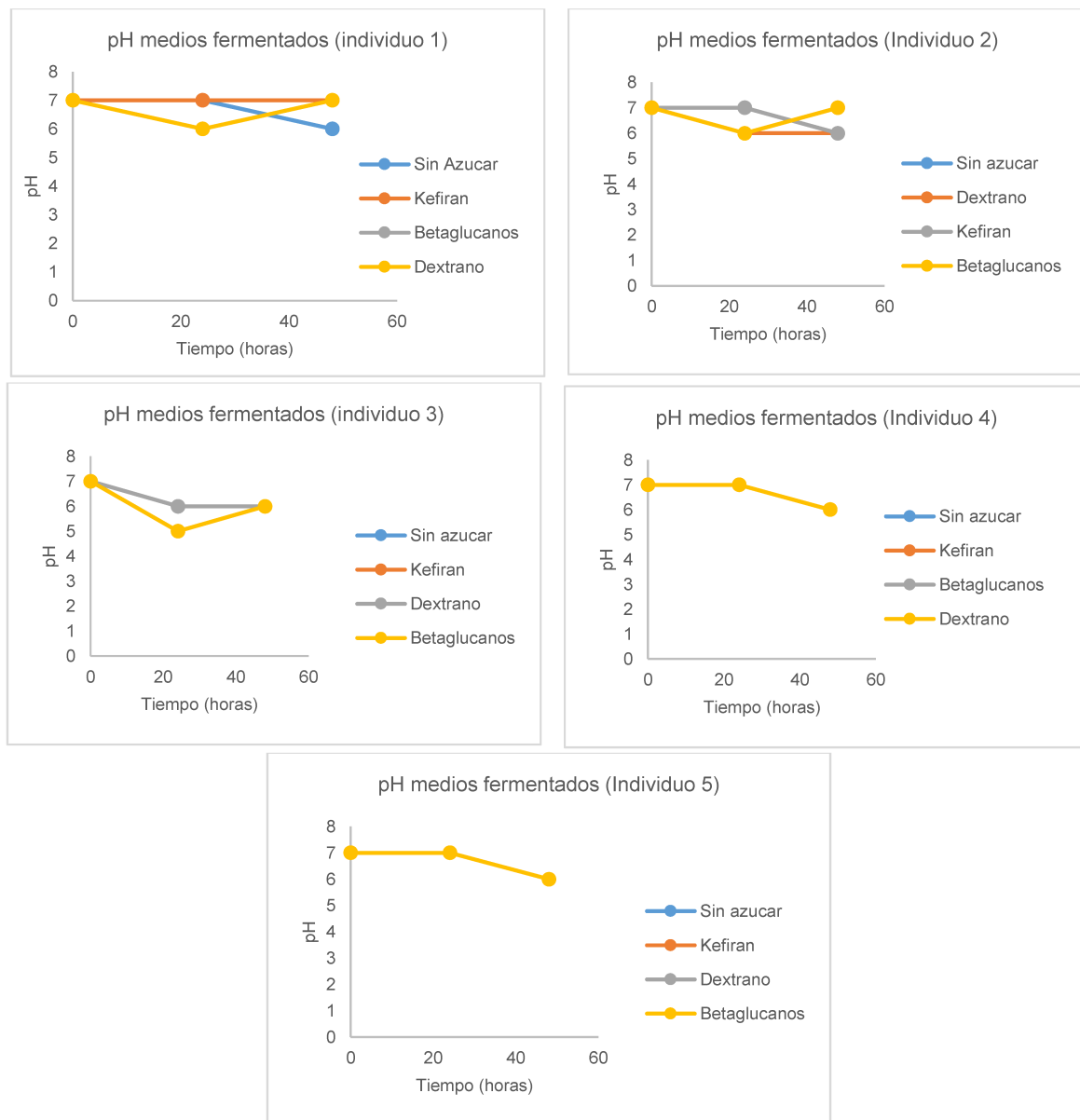


FIGURA 17: pH de los medios al inicio del experimento, a las 24 hs y 48 hs de iniciado el proceso de fermentación.

En la mayoría de los casos, el pH pasó de 7 (tiempo 0) a 6 (luego de 48 horas de fermentación). No se observaron valores menores a pH 6 en las condiciones ensayadas. La acidificación, descrita también por otros autores (Al-Tamimi *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2014; Medrano *et al.*, 2020), se correlaciona con la generación y presencia de ácidos dentro del medio de cultivo, producto de la fermentación.

4.3.2 Contenido de ácidos orgánicos

El contenido de ácidos orgánicos presentes en la materia fecal inicial, así como el de los medios fermentados, se evaluó mediante cromatografía gaseosa. En la Tabla 5 se muestran los tiempos de retención correspondientes a los ácidos incluidos en el estudio, parámetro que permite su identificación.

Tabla 5: Tiempos de retención en la columna cromatográfica de los ácidos incluidos como patrones en el estudio.

Acido orgánico	Tiempo de retención (minutos)
fórmico	1.2
acético	2.8
propiónico	3.6
isobutírico	2.9
butírico	4.7
isovalérico	5.3
valérico	6.3
isohexanoico	7.6
hexanoico	8.5
heptanoico	10.5

Con los ácidos acético, propiónico y butírico, que fueron los ácidos que se detectaron en la mayoría de las muestras, se realizaron curvas de calibración utilizando diferentes concentraciones y relevando el área de los picos correspondientes. En la Figura 18 se presentan las curvas de calibración correspondientes a los tres ácidos antes mencionados. Otros ácidos orgánicos, como el isobutírico y valérico, no fueron detectados en las condiciones del ensayo, mientras que el ácido isovalérico fue detectado en pequeña cantidad, fuera del rango de sensibilidad del equipo.

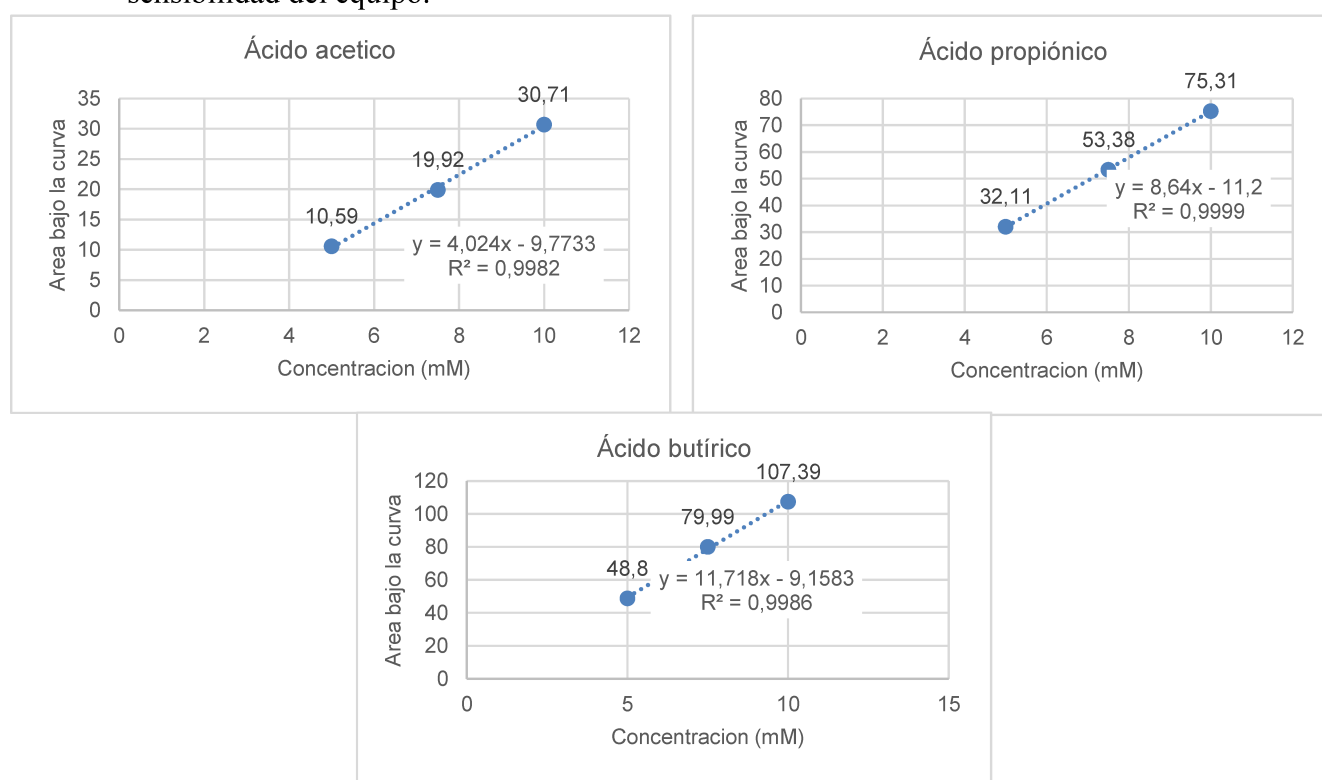


Figura 18: Área de los picos en función de la concentración para las curvas de calibración correspondientes a los ácidos acético, propiónico y butírico. Se muestra la ecuación correspondiente al ajuste de los puntos experimentales a una recta y el coeficiente de correlación (R^2) de dicha regresión lineal.

4.3.3 Contenido de ácidos en la materia fecal inicial

La materia fecal de los 5 donantes contenía ácidos orgánicos en diferente proporción al inicio del experimento. En la Figura 19 se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma con el perfil de ácidos orgánicos presentes en la materia fecal del individuo 1.

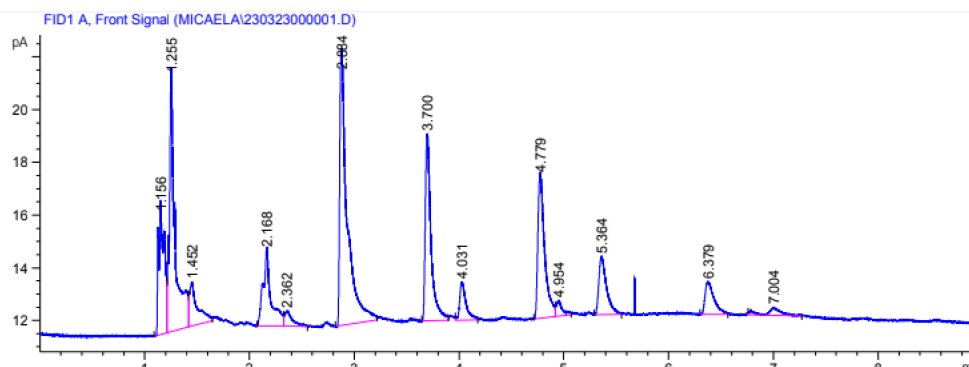


Figura 19: Ejemplo de cromatograma correspondiente a la materia fecal del individuo 1. Eje y: Señal en detector FID; eje x: Tiempo de retención en minutos.

Utilizando las curvas de calibración, se cuantificaron los ácidos orgánicos presentes en la materia fecal de todos los individuos. Como puede observarse en la Figura 20, el ácido acético fue mayoritario en todos los casos, seguido por el ácido propiónico y luego por el ácido butírico. Esta proporción es la encontrada habitualmente en la materia fecal en concordancia con datos bibliográficos (Al Tamimi *et al.*, 2006; Rau *et al.*, 2018).

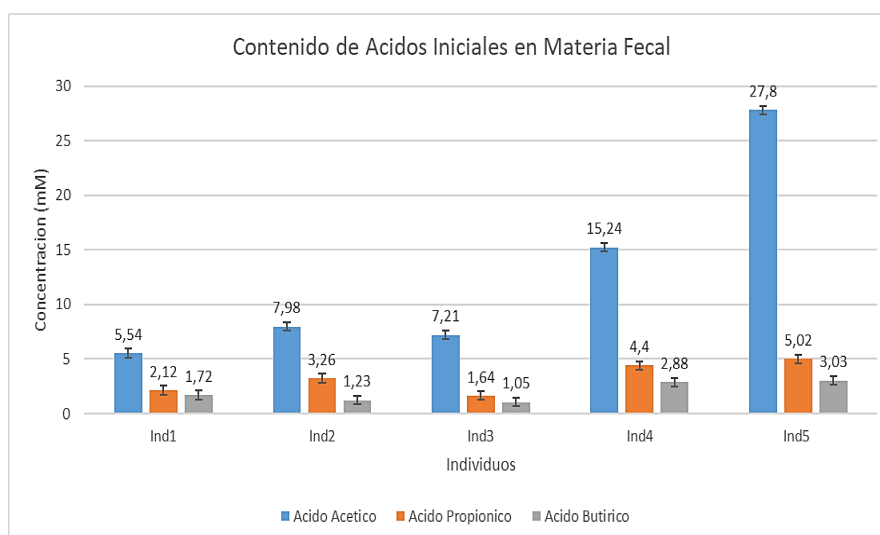


Figura 20: Concentraciones de los ácidos acético, propiónico y butírico en la materia fecal de los distintos individuos.

Por otro lado, el individuo 1 fue el que presentó menor concentración de ácidos totales en la materia fecal (9,38 mM), luego los individuos 2 y 3 presentaron concentraciones intermedias (12,47 mM y 9,9 mM respectivamente) y finalmente, los individuos 4 y 5 presentaron las mayores concentraciones (22,52 mM y 35,85 mM respectivamente). Estas diferencias en cuanto a las concentraciones de cada ácido o, a las totales, indican una diferencia en la composición de la microbiota intestinal, así como de los metabolitos producidos por ésta.

4.3.4 Producción de ácidos orgánicos debida a la fermentación de los polisacáridos

Luego de 24 horas de fermentación pudo observarse, en todos los casos, que los microorganismos presentes en los barros fecales fueron capaces de producir ácidos orgánicos en los medios de cultivo, en el medio control con glucosa como en los medios conteniendo los tres polisacáridos. En la Figura 21 se presentan las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en los medios de cultivo conteniendo glucosa fermentados durante 24 o 48 horas con la materia fecal de cada uno de los 5 individuos. En todos los casos, la concentración de ácidos orgánicos se incrementó respecto de la inicial para cada individuo. Como puede observarse en la Figura 21 en líneas generales y para los 5 individuos:

- Los valores de concentración de ácido acético producido luego de 48 hs estuvieron entre 5,14 y 12,92 mM
- Los valores de concentración de ácido propiónico luego de 48 hs estuvieron entre 0 y 4,84 mM
- Los valores de concentración de ácido butírico luego de 48 hs estuvieron entre 1,64 y 7,95 mM

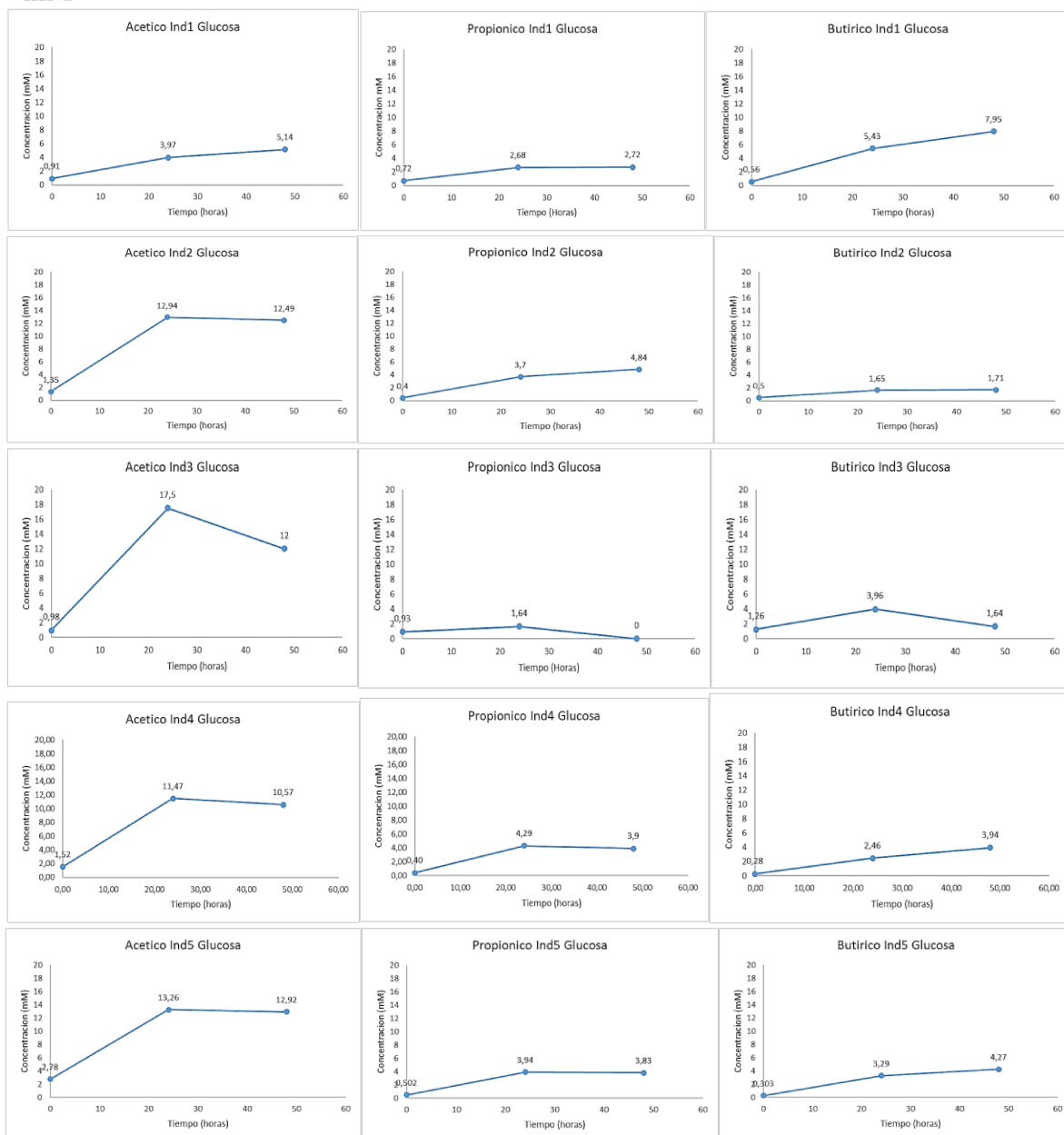


Figura 21: Concentraciones de los ácidos acético, propiónico y butírico en función del tiempo de fermentación, en los medios conteniendo glucosa, inoculados con los barros fecales de los cinco individuos.

Al comparar los resultados de la producción de ácidos luego de 24 y 48 horas de fermentación, se pudo observar que la respuesta de las bacterias intestinales provenientes de los diferentes individuos frente a un mismo sustrato fue diferente.

Si bien pudo observarse que el ácido acético fue el que se encontró en mayores concentraciones en los ensayos correspondientes a los individuos 2, 3, 4 y 5 (con patologías intestinales), en las muestras correspondientes al individuo 1 (sin patología), el ácido butírico fue el mayoritario a las 48 horas de fermentación del medio conteniendo glucosa (7,95 mM).

Además, la microbiota de los individuos 2 y 3 (afectados de pólipos intestinales y cáncer de colon respectivamente) produjo concentraciones muy bajas de ácido butírico (1,71 y 1,64 mM respectivamente), mientras que la proveniente de los individuos 4 y 5 (con diagnóstico confirmado y sospecha de colitis ulcerosa, respectivamente) produjo ácido butírico en concentraciones equivalentes a las del ácido propiónico (valores comprendidos entre 3,83 y 4,27 mM).

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que la respuesta de la microbiota proveniente de cada individuo responde de manera diferente frente a la presencia de glucosa en el medio de fermentación. Este resultado está en concordancia con lo descrito por otros autores con respecto a la variación inter-individuos y a la respuesta individual de la microbiota en la fermentación de carbohidratos (Aguirre *et al.*, 2014; Hamet *et al.*, 2016; Medrano *et al.*, 2020). Estos resultados justificaron avanzar con el estudio de la fermentación de los diferentes polisacáridos con barros fecales generados a partir de materia fecal de los diferentes individuos.

4.3.5 Comparación de perfiles de fermentación

Así como la fermentación de los medios conteniendo glucosa generó diferentes perfiles de producción de ácidos orgánicos, pudo observarse también que la concentración de cada uno de los ácidos no fue equivalente entre individuos para la fermentación los polisacáridos incluidos en el estudio. A continuación, se analizan los resultados obtenidos en los ensayos de fermentación con materia fecal de cada individuo.

Individuo 1 (sin patología intestinal)

Ácido acético

La microbiota presente en la materia fecal de este individuo produjo ácido acético en los medios conteniendo los tres polisacáridos evaluados y en el medio con glucosa a partir de las 24 horas como puede observarse en la Figura 22.

Se pudo observar que la producción de ácido acético a las 48 horas fue significativamente mayor en el medio conteniendo **dextrano** (15,65 mM) en comparación con los medios con glucosa (5,14 mM), con β -glucanos (5,6 mM) o con kefiran (9,30 mM).

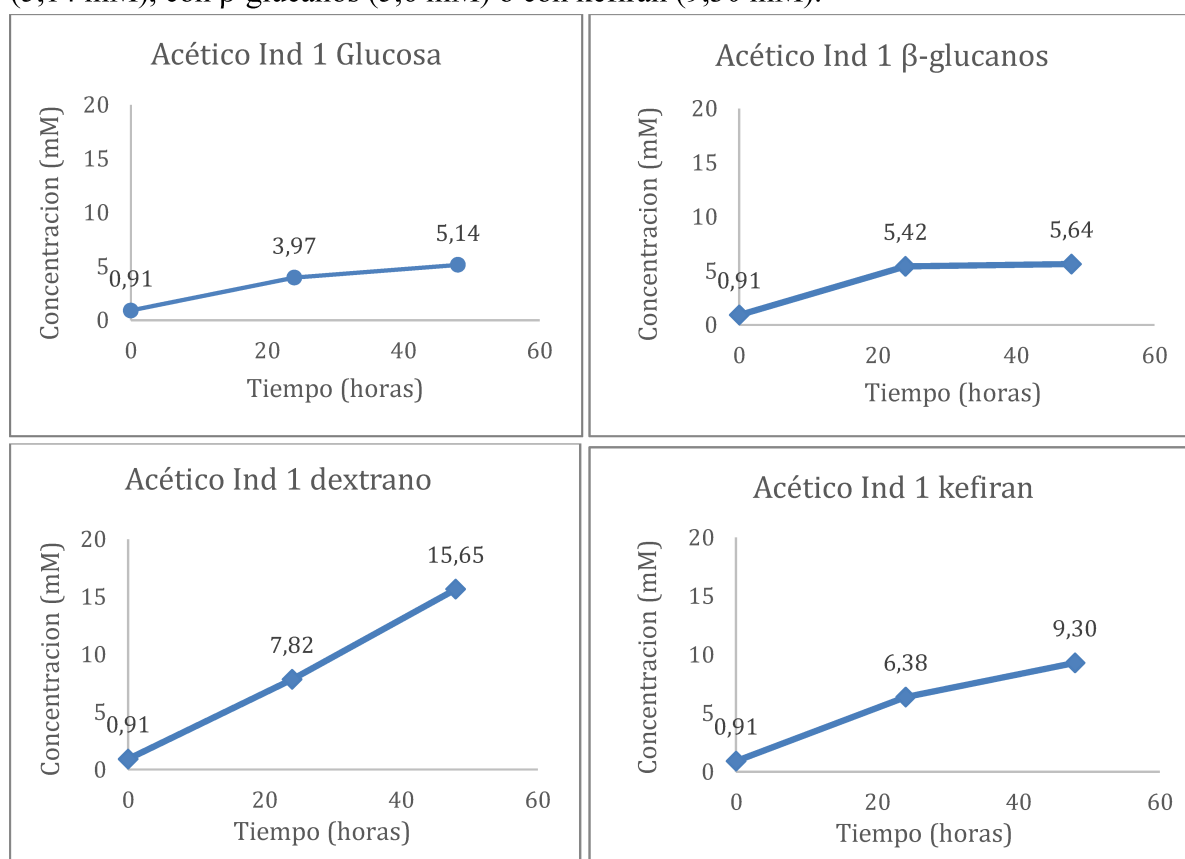


Figura 22: Cinéticas de producción de ácido acético en los diferentes medios de cultivo para el Individuo 1. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido propiónico

La microbiota presente en la materia fecal del individuo 1 produjo ácido propiónico en los medios conteniendo los distintos polisacáridos y también en el medio con glucosa a las 24 y 48 hs, como se observa en la Figura 23. La mayor producción de ácido propiónico se observó en el medio conteniendo **dextrano** a las 48 hs (5,33 mM) en comparación con los medios con glucosa (2,72 mM), β -glucanos (2,67 mM) y kefiran (2,60 mM).

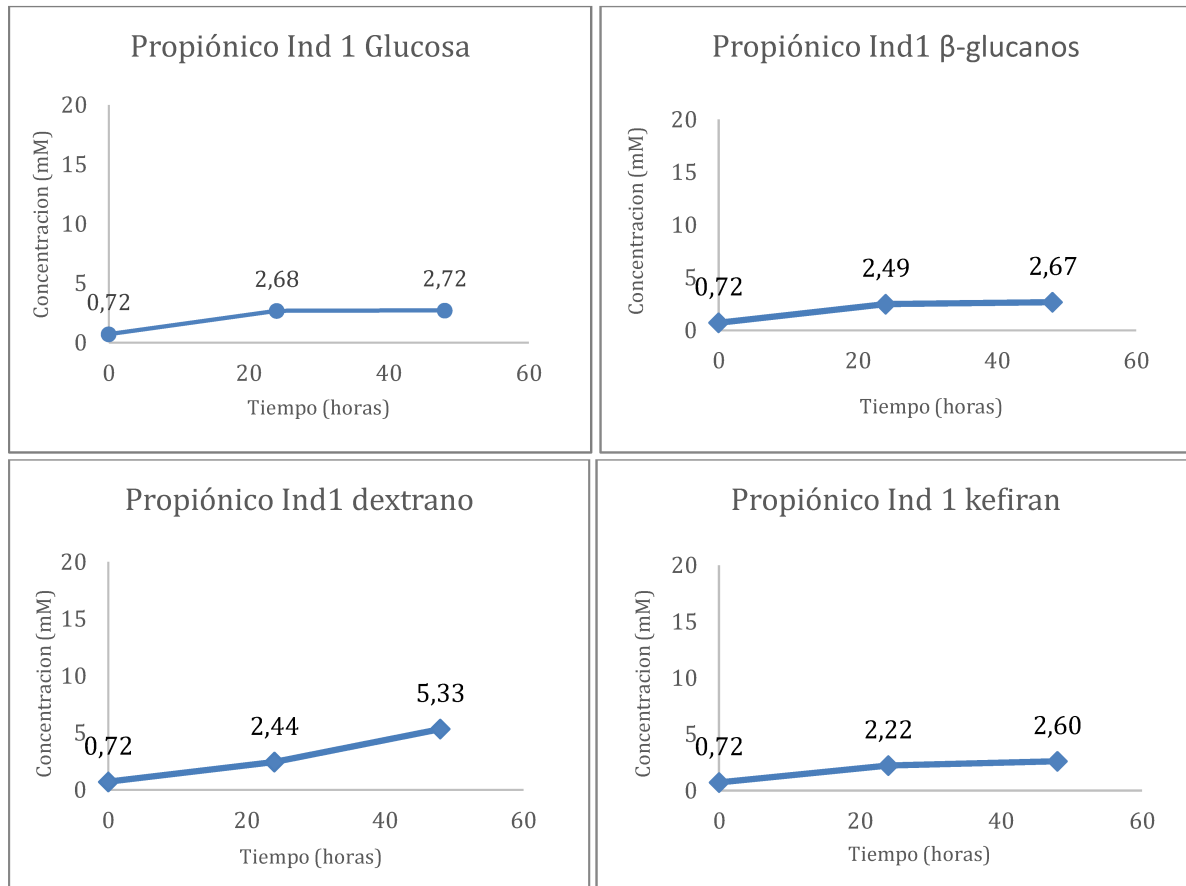


Figura 23: Cinéticas de producción de ácido propiónico en el individuo 1 para los distintos medios de cultivo. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido butírico

La microbiota presente en la materia fecal del individuo 1 produjo ácido butírico en los medios conteniendo los tres polisacáridos y también en el medio con glucosa (Figura 24). La mayor producción de ácido propiónico se observó en el medio con glucosa a las 48 hs (7,95 mM), lo cual no es sorprendente, ya que la glucosa puede ser utilizada como fuente de carbohidratos por la mayor parte de los microorganismos. Entre los medios conteniendo polisacáridos, el medio con **dextrano** fue el que presentó la mayor concentración de ácido butírico a las 48 horas (5,11 mM) en comparación con los medios con β -glucanos (1,76 mM) y kefiran (2,76 mM).

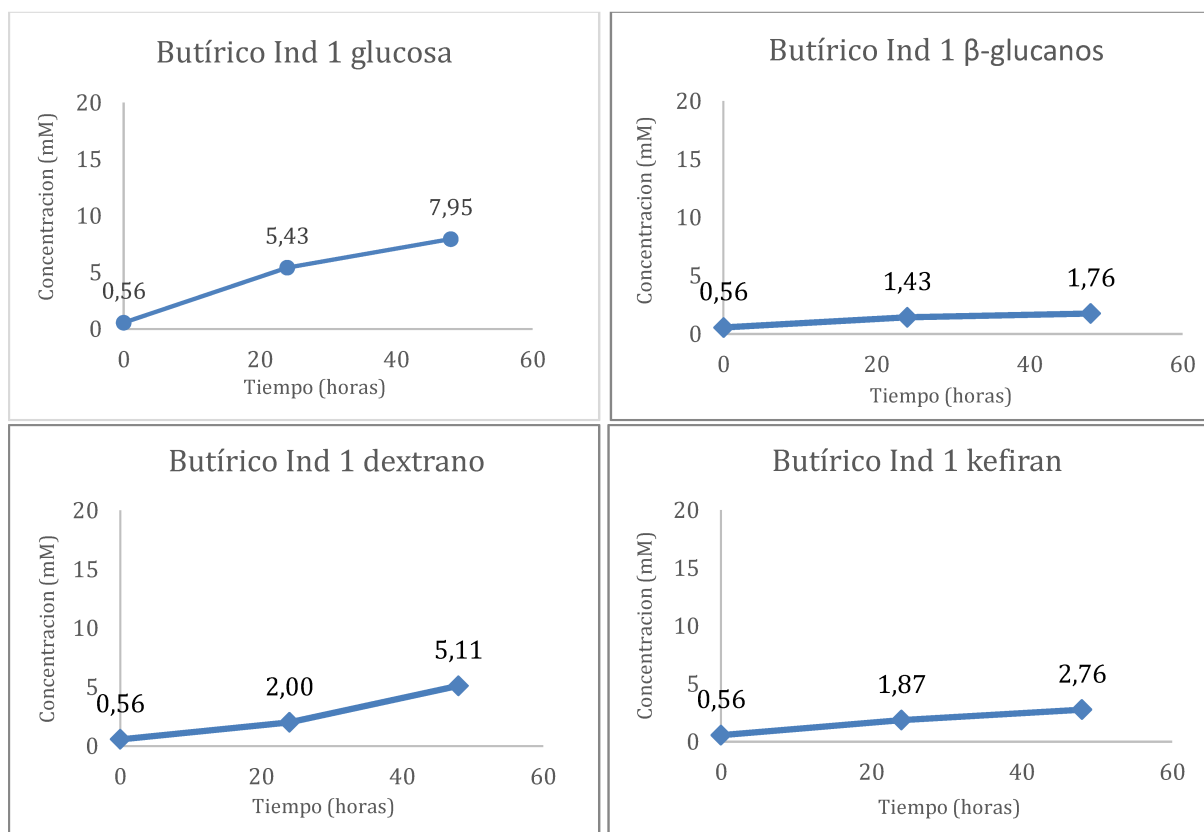


Figura 24: Cinéticas de producción de ácido butírico en el individuo 1 para los distintos medios de fermentación evaluados. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

De acuerdo con el análisis de resultados obtenidos en el ensayo de fermentación para el individuo 1, y a partir de la comparación de las cantidades de ácidos obtenidas para cada fibra, se puede concluir que la microbiota presente en su materia fecal pudo responder mejor a la fibra proveniente de los gránulos de kefir de agua (**dextrano**), obteniendo una producción de ácido acético, propiónico y butírico en concentraciones de 15,65, 5,33 y 5,11 mM respectivamente. Estas concentraciones fueron significativamente mayores que las obtenidas en los medios conteniendo los otros polisacáridos.

Individuo 2 (pólipos intestinales)

Ácido acético

La microbiota presente en la materia fecal de este individuo produjo ácido acético a partir de las 24 horas en todos los medios (Figura 25). La mayor concentración de ácido acético se observó en el medio con glucosa, a las 24 hs (12,94 mM) y luego se mantuvo constante hasta las 48 horas. En el medio conteniendo **dextrano**, se observó que el contenido de ácido acético fue elevado a las 48 horas (10,42 mM), con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los medios conteniendo β -glucanos (5,36 mM) o kefiran (9,12 mM).

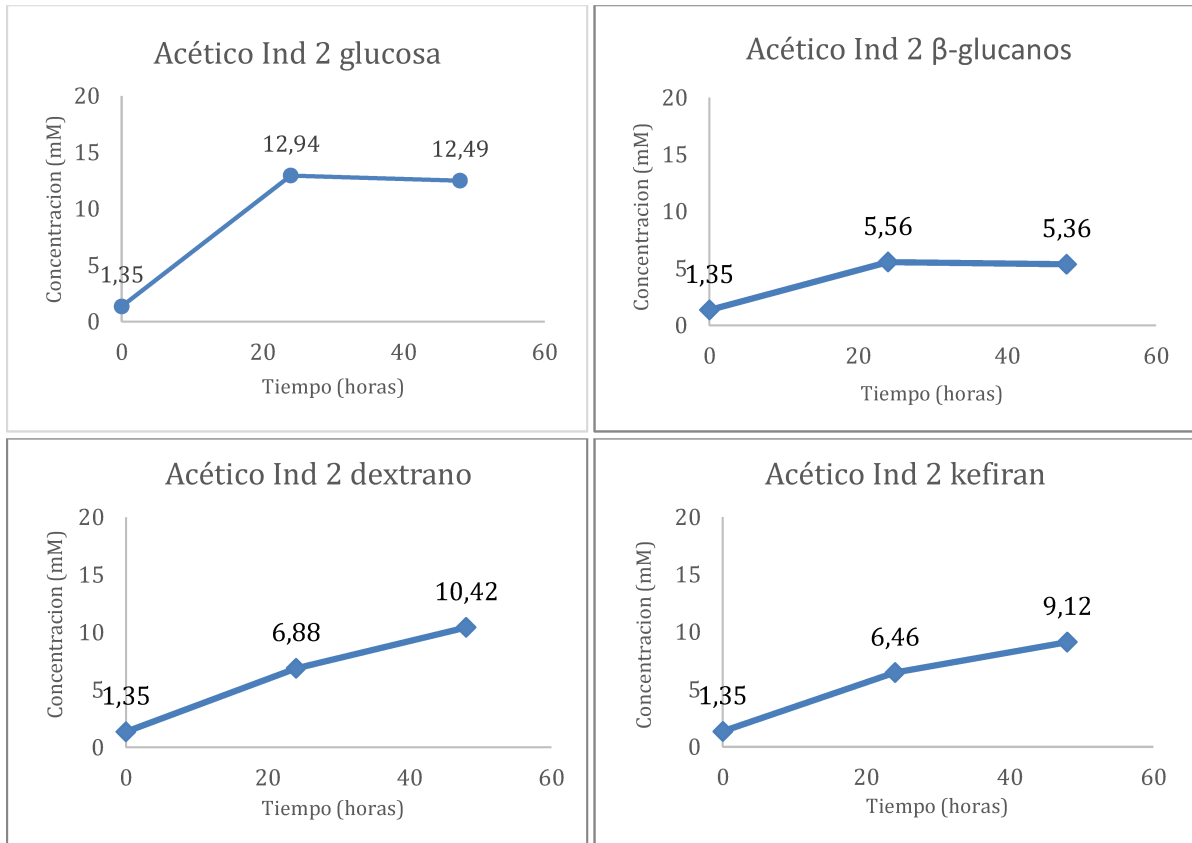


Figura 25: Cinéticas de producción de ácido acético en el individuo 2 para los distintos medios de cultivo conteniendo glucosa, β -glucanos, dextrano y kefiran. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido propiónico

Como se puede observar en la Figura 26, en todos los medios fermentados por la microbiota del individuo 2, el ácido propiónico se produjo a partir de las 24 horas. A las 48 horas, el medio conteniendo **dextrano** presentó una concentración de este ácido igual a 5,27 mM, mayor a la encontrada en los medios con glucosa (4,84 mM), β -glucanos (2,86 mM) o kefirán (3,43 mM).

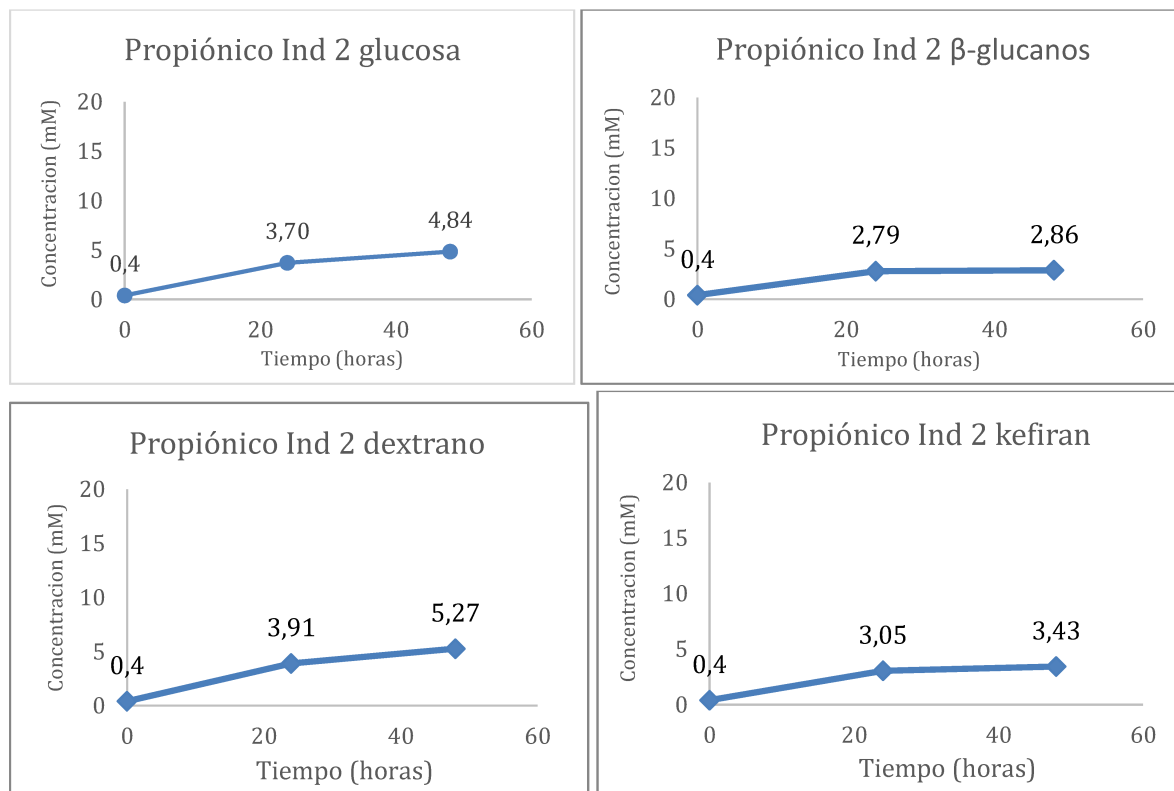


Figura 26: Cinéticas de producción de ácido propiónico en el individuo 2 para los distintos medios de cultivo. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido butírico

El ácido butírico se presentó en todos los medios de fermentación ensayados, siendo producido a las 24 y 48 horas (Figura 27). A las 48 horas de fermentación, el medio adicionado con β -**glucanos** mostró la mayor concentración de este ácido (3,07 mM), en comparación con los medios conteniendo dextrano y kefirán (2,37 mM y 2,60 mM respectivamente), e incluso mayor que la concentración hallada en el medio con glucosa (1,71 mM).

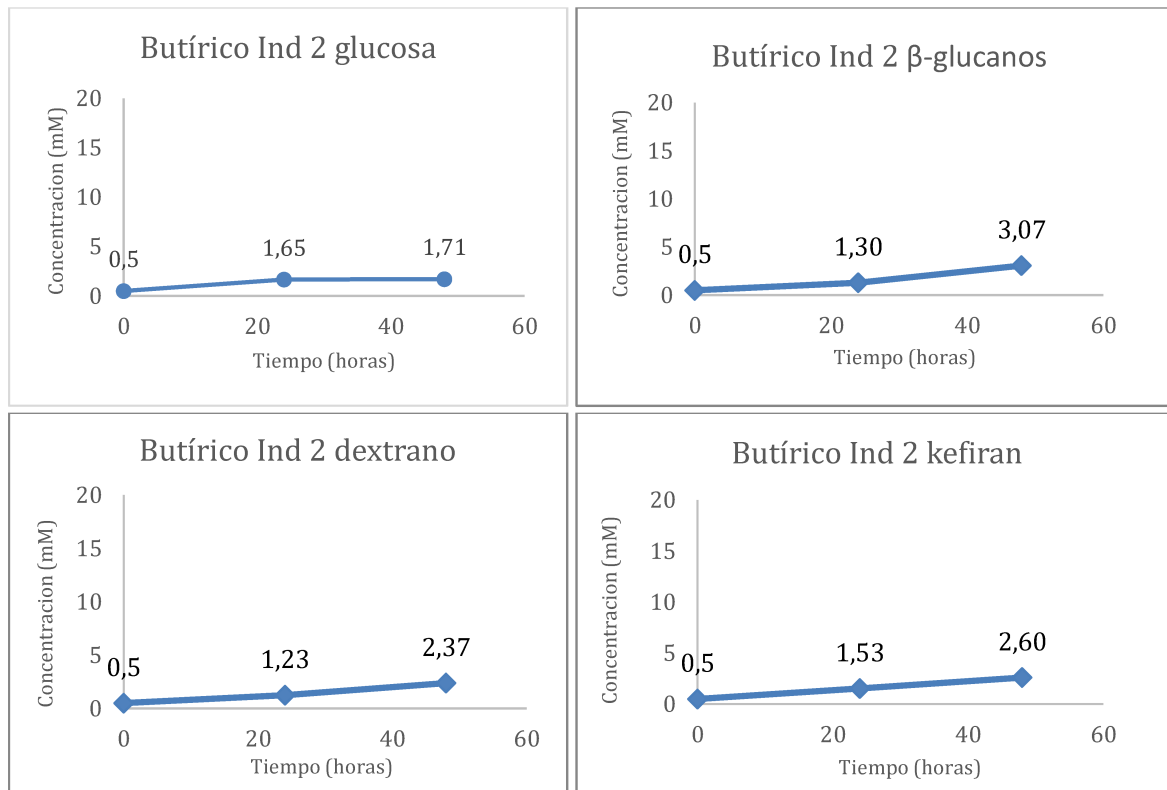


Figura 27: Cinéticas de producción de ácido butírico en los diferentes medios de fermentación adicionado con glucosa, β -glucanos, dextrano y kefirán. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

A partir de los resultados de las fermentaciones utilizando la materia fecal del individuo 2 puede observarse que la producción de ácido acético y propiónico se vio estimulada por el **dextrano**, mientras que la producción de ácido butírico fue estimulada por los **β -glucanos**.

Individuo 3 (cáncer colorrectal)

Ácido acético

El ácido acético se produjo en todos los medios a partir de las 24 horas de fermentación, tanto en aquellos que contenían los polisacáridos como en el medio con glucosa (Figura 28).

La mayor concentración de ácido acético se observó en el medio con glucosa a las 24 horas (17,5 mM) para luego descender (12 mM), probablemente a causa del *cross-feeding* (Louis & Flint, 2017). En segundo lugar, luego de 48 horas de fermentación, la inclusión de **kefiran** en el medio generó una mayor concentración de ácido acético (16,75 mM) en comparación con la encontrada en el resto de los medios.

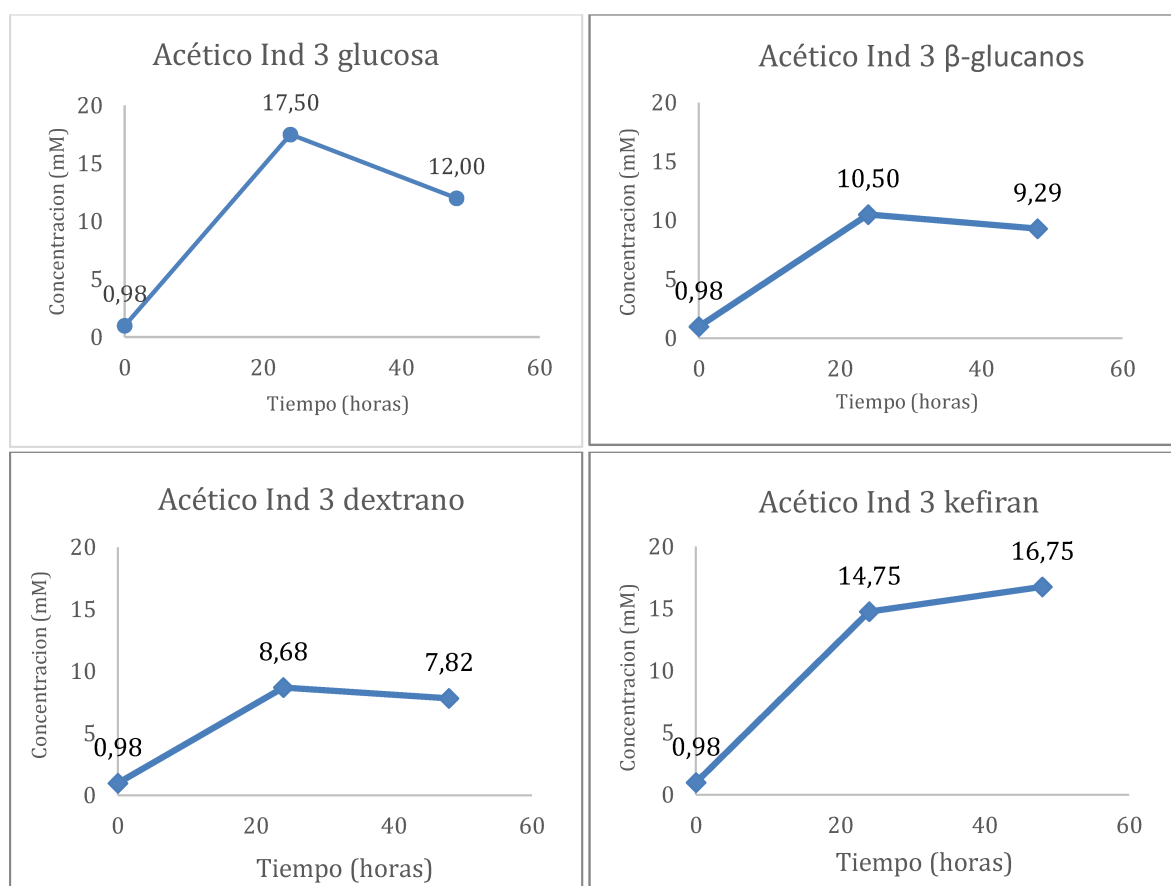


Figura 28: Cinéticas de producción de ácido acético en los distintos medios con microbiota proveniente del individuo 3. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido propiónico

El ácido propiónico se produjo en pequeña cantidad en todos los medios a partir de las 24 horas y hasta las 48 horas, en valores de hasta 2,11 mM. Si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas, a las 48 horas, el medio conteniendo **kefiran** presentó la máxima concentración de ácido propiónico (2,11 mM) mientras que en el medio con glucosa la cantidad no fue detectable y en los medios con los otros polisacáridos resultó de 1,8 y 1,64 mM para el agregado de β -glucanos y dextrano respectivamente.

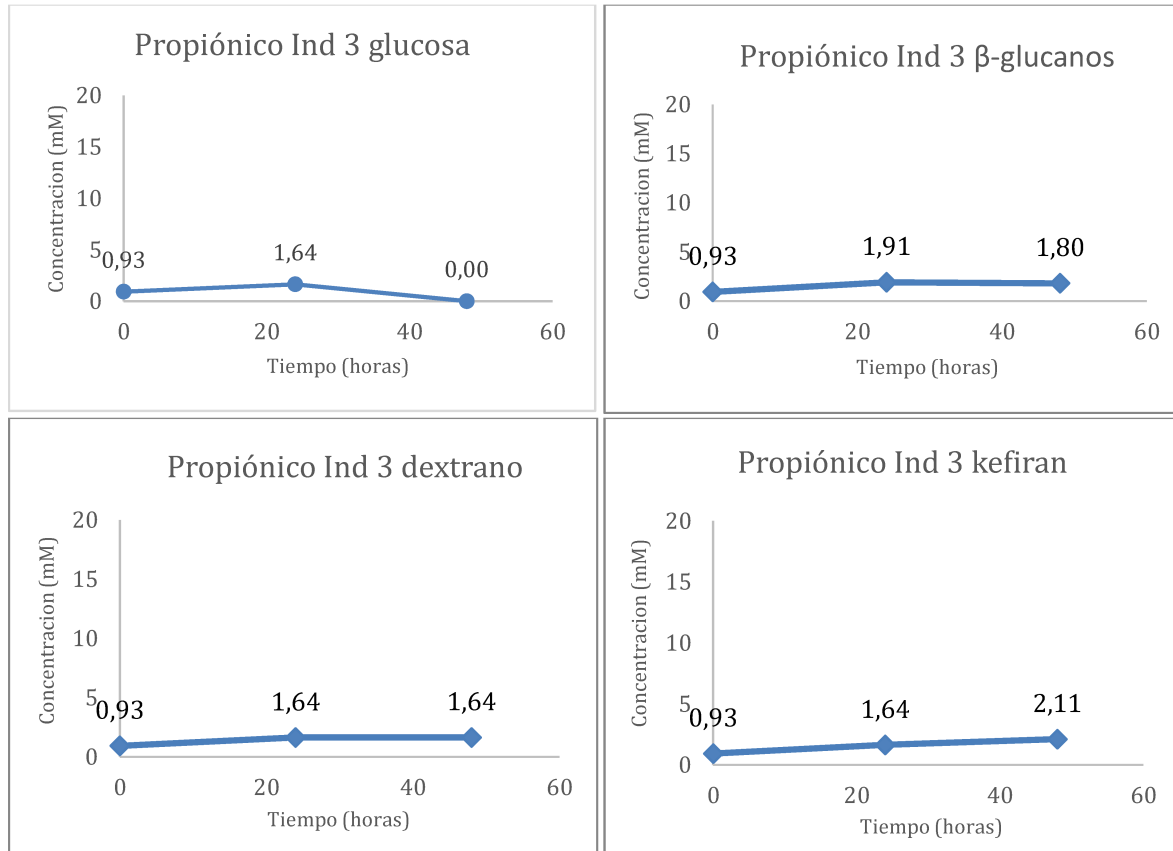


Figura 29: Cinéticas de producción de ácido propiónico en los distintos medios fermentados con microbiota proveniente del individuo 3. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Acido butírico

La concentración de ácido butírico, a partir de las 24 horas de fermentación, se mantuvo aproximadamente constante en todos los medios conteniendo los polisacáridos (Figura 30), mientras que en el medio conteniendo glucosa se observó un incremento significativo a las 24 hs y luego una disminución. A las 48 horas, el medio con **kefiran** presentó la mayor concentración de este ácido (2,05 mM) respecto al medio control con glucosa (1,64 mM). Los medios adicionados con β -glucanos y dextrano mostraron menor producción de ácido butírico, lo cual podría indicar la incapacidad de la microbiota de este individuo de fermentar estas fibras.

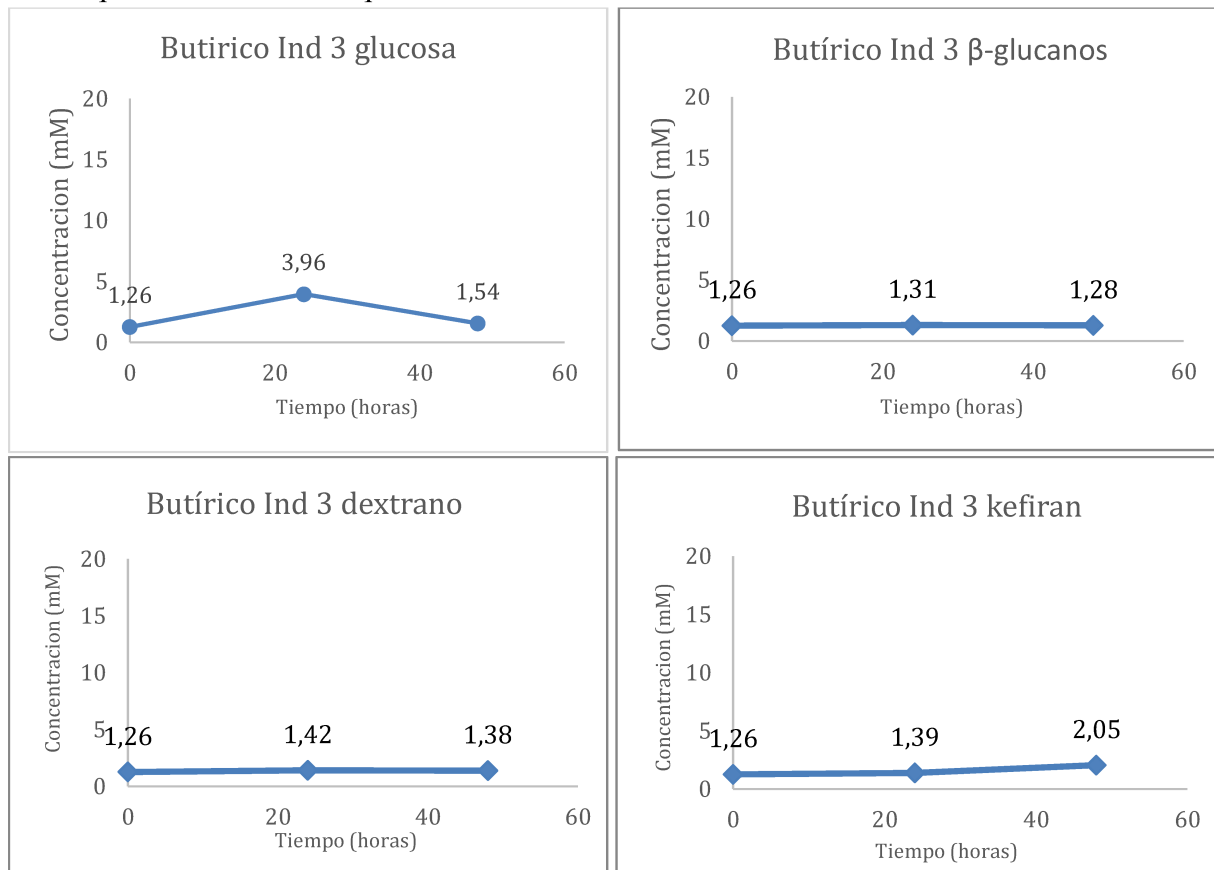


Figura 30: Cinéticas de producción de ácido butírico en los diferentes medios fermentados con microbiota proveniente del individuo 3. Concentración (mM) vs tiempo (horas)

De acuerdo con los resultados, la microbiota presente en la materia fecal del individuo 3 demostró la capacidad de producir grandes cantidades de ácido acético a las 24 hs en todos los medios. Sin embargo, a las 48 hs la cantidad de este ácido disminuyó considerablemente en los medios conteniendo β -glucanos y dextrano. Este comportamiento se repitió con los ácidos propiónico y butírico. Esto podría indicar la incapacidad de la microbiota de este individuo de utilizar estas fibras como fuente de carbono. Contrariamente, en el medio conteniendo glucosa o kefiran, la producción de los tres ácidos se mantuvo o se incrementó de modo significativo (para el caso del ácido acético) y de modo leve para los ácidos propiónico y butírico.

Es necesario resaltar que la producción de ácido butírico fue reducida. Esto puede explicarse dado el diagnóstico de cáncer de colon de este individuo. La correlación entre una disminución en la población de bacterias productoras de butirato y la incidencia de cáncer de colon ha sido ya documentada (Zhang *et al.*, 2021). Por lo tanto, una microbiota alterada que no produce ácido butírico podría estar presente en este caso.

Individuo 4 (diagnóstico de colitis ulcerosa)

Ácido acético

Las bacterias presentes en la materia fecal de este individuo produjeron ácido acético a partir de las 24 hs en todos los medios como se observa en la Figura 31.

En todos los medios, a excepción del que contenía dextrano, las concentraciones máximas de ácido acético se encontraron a las 24 horas, y luego se observó una leve disminución, probablemente debida al *cross-feeding* (Louis & Flint, 2017).

Las concentraciones de ácido acético a las 24 y 48 horas fueron similares en todos los medios. Sin embargo, a las 48 horas, la concentración de este ácido fue levemente mayor en el medio con glucosa (10,57 mM), seguida de la correspondiente al medio con **kefiran** (10,18 mM).

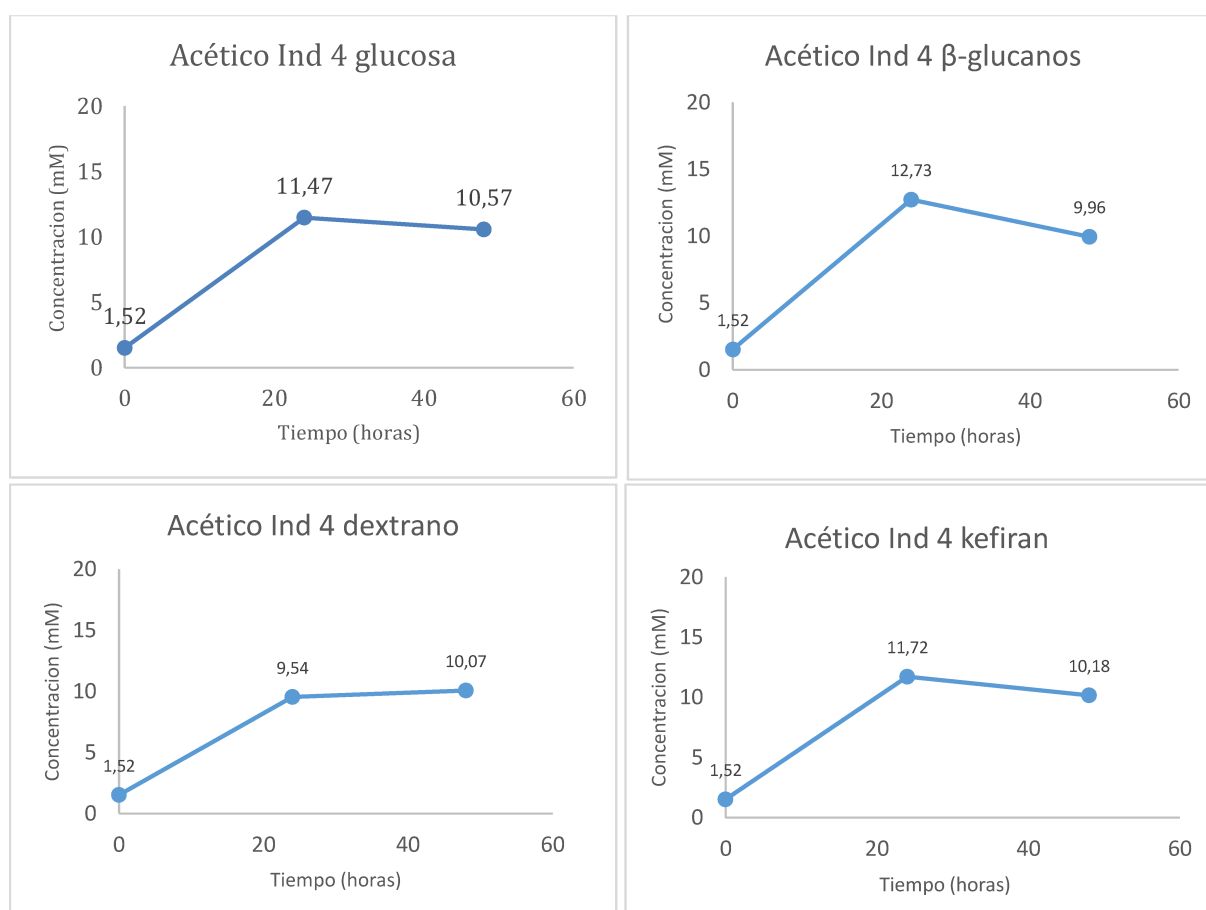


Figura 31: Cinéticas de producción de ácido acético en los distintos medios de fermentación empleando microbiota proveniente del individuo 4. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido propiónico

Se observó la presencia de este ácido en todos los medios a partir de las 24 horas (Figura 32). La mayor concentración de ácido propiónico se encontró en el medio con β -glucanos luego de 24 horas de fermentación (4,3 mM), y fue similar a la encontrada en el medio conteniendo glucosa (4,29 mM) y mayor a la producida en los medios con las otras fibras (3,15 mM y 2,37 mM para el kefirán y el dextrano respectivamente).

Si bien en el medio conteniendo β -glucanos hubo una disminución del contenido de ácido propiónico a las 48 horas de fermentación, este medio presentó la mayor concentración de ácido propiónico en comparación con los que incluyeron los otros dos polisacáridos y similar al medio control conteniendo glucosa.

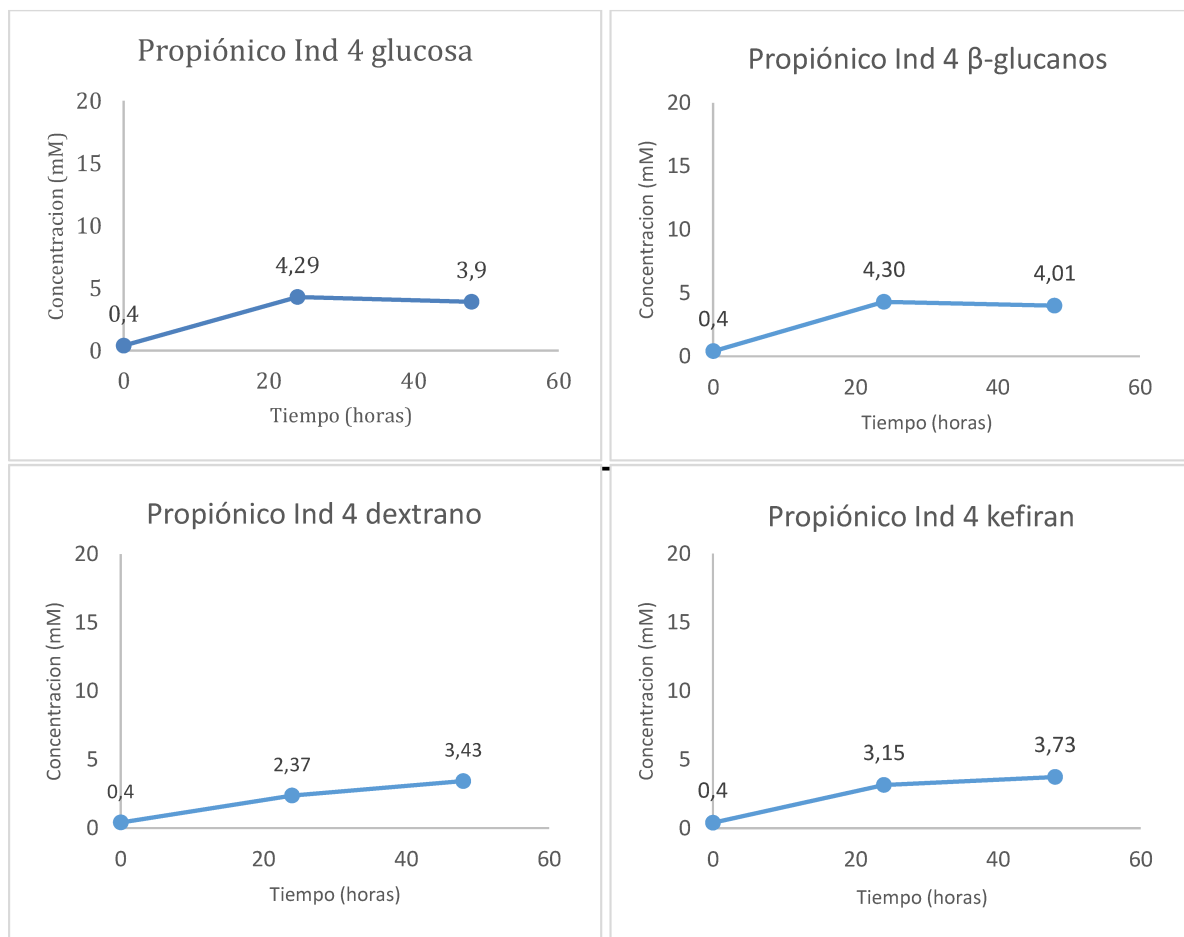


Figura 32: Cinéticas de producción de ácido propiónico en los distintos medios de cultivo con microbiota proveniente del individuo 4. Concentración (mM) vs tiempo (horas)

Ácido butírico

Se observó la presencia de ácido butírico en todos los medios a las 24 y 48 hs. La mayor concentración se encontró en el medio conteniendo β -glucanos a las 48 hs (4,09 mM) en comparación con la hallada en el medio con glucosa (3,94 mM) y en los medios con los otros polisacáridos (3,4 mM para el kefirán y 2,16 mM para el dextrano) (Figura 33).

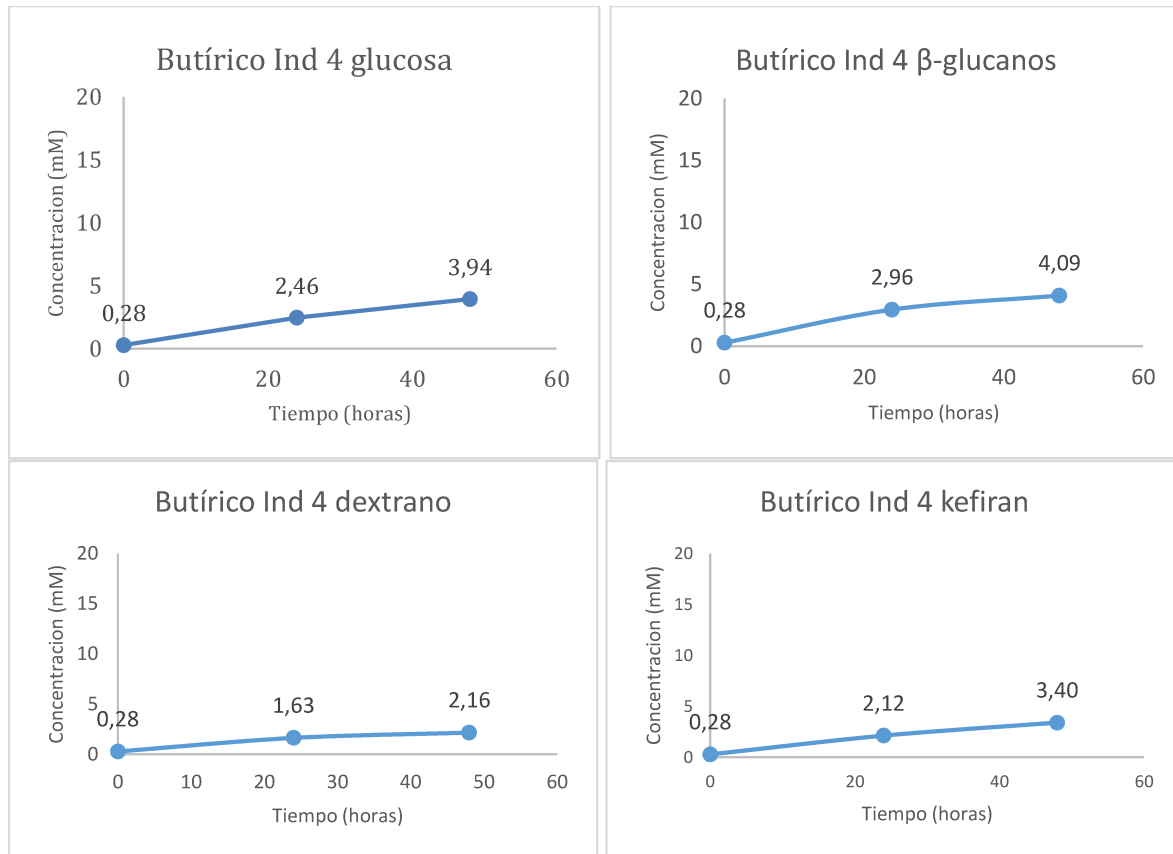


Figura 33: Cinéticas de producción de ácido butírico en los distintos medios de cultivo fermentados con microbiota proveniente del individuo 4. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

De acuerdo con los resultados obtenidos, pudo notarse que la microbiota presente en la materia fecal del individuo 4, fue capaz de inducir, preponderantemente, la síntesis de ácido acético utilizando kefirán como fuente de carbohidratos. Sin embargo, en lo que respecta a producción de ácidos propiónico y butírico, solo se puede adjudicar este proceso a la fermentación de los β -glucanos.

Individuo 5 (probable colitis ulcerosa)

Ácido acético

La producción de ácido acético se observó en todos los medios a las 24 y 48 horas de fermentación (Figura 34). La mayor concentración se presentó en el medio con el agregado de **kefiran** como fuente de azúcar fermentable, tanto a las 24 como a las 48 horas (14,05 y 13,76 mM respectivamente), en comparación con la hallada en el resto de los medios conteniendo los otros polisacáridos e, incluso, en comparación con el medio conteniendo glucosa.

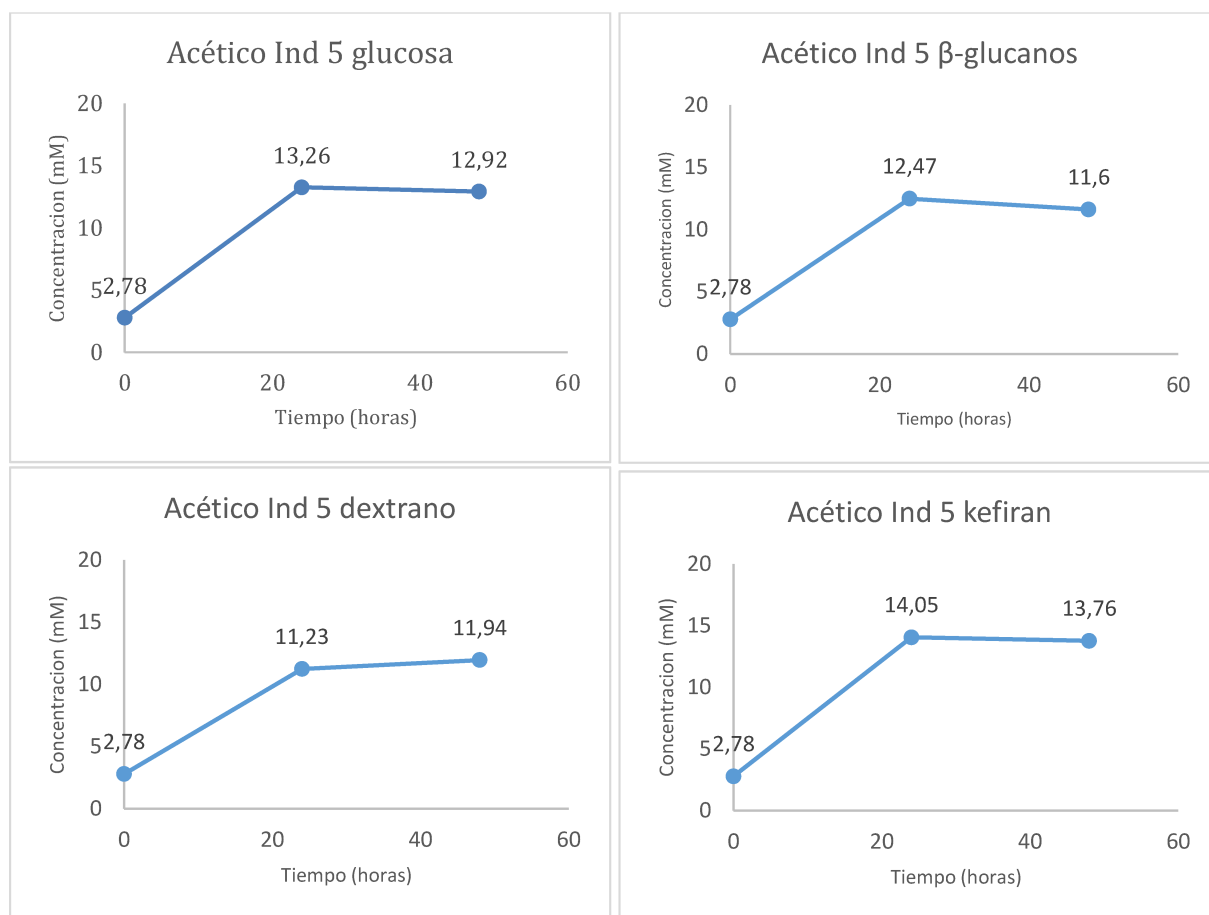


Figura 34: Concentración de ácido acético en los medios de fermentación conteniendo los diferentes polisacáridos con microbiota proveniente del individuo 5. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido propiónico

El ácido propiónico fue producido en los medios adicionados con los tres polisacáridos, así como en el medio control conteniendo glucosa (Figura 35). La mayor concentración de este ácido se encontró en el medio conteniendo **dextrano** a las 48 horas de fermentación (4,7 mM) en comparación con la correspondiente al medio con glucosa (3,83 mM) o con el resto de los polisacáridos (4,24 mM para el kefirán y 4,26 mM para los β -glucanos).

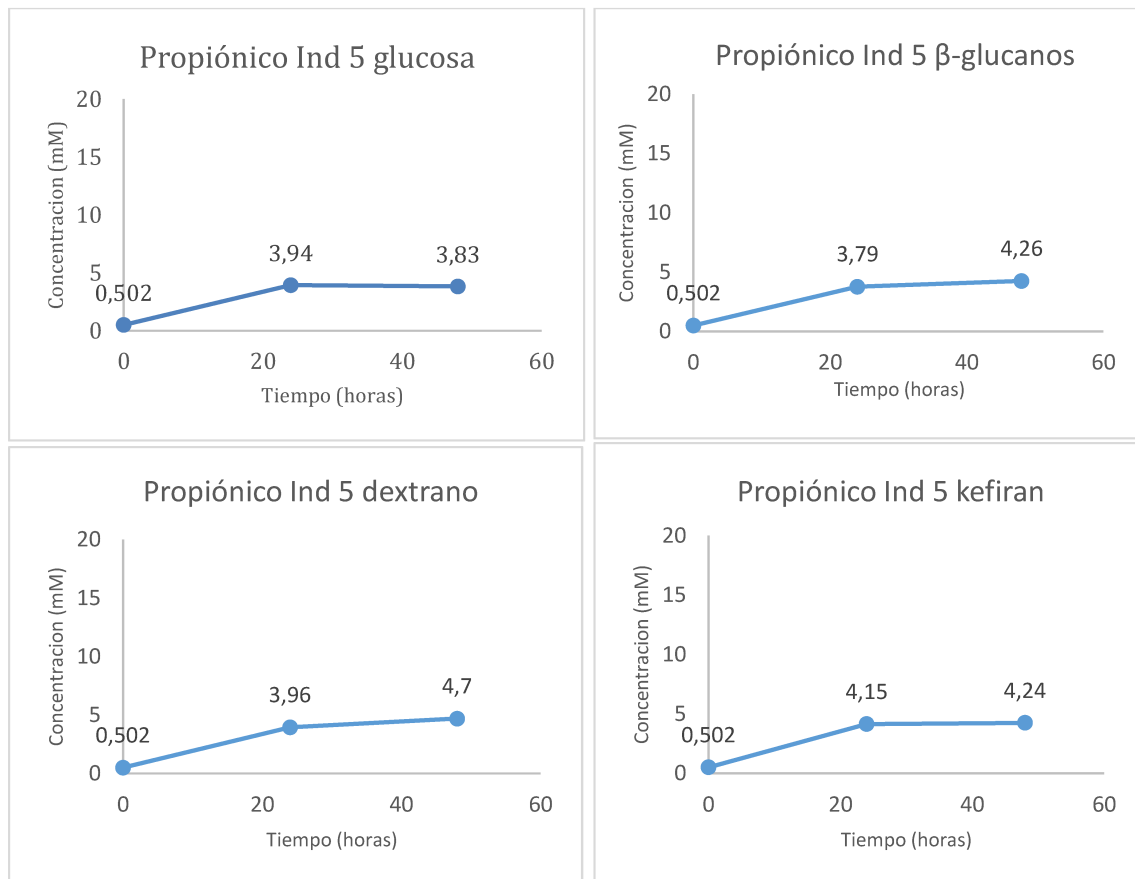


Figura 35: Cinéticas de producción de ácido propiónico en los distintos medios de cultivo fermentados por microbiota proveniente del individuo 5. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Ácido butírico

Se produjo ácido butírico a partir de las 24 horas en todos los medios (Figura 36). La mayor concentración de este ácido se halló en el medio adicionado con glucosa a las 48 horas (4,27 mM) seguida por la encontrada en el medio con **kefiran** a las 48 horas (3,27 mM), esta última también significativamente mayor que la presente en el medio conteniendo dextrano (2,89 mM).

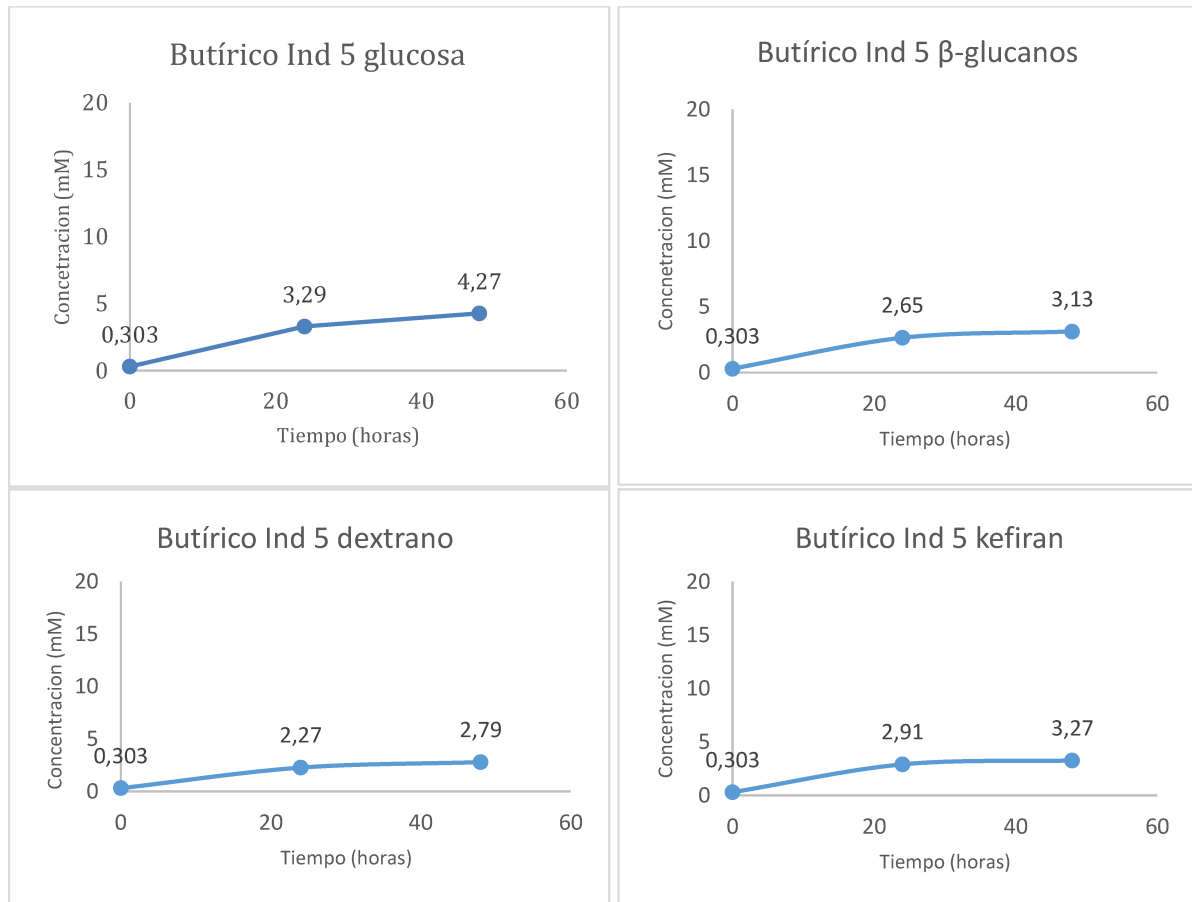


Figura 36: Cinéticas de producción de ácido butírico en los distintos medios de cultivo fermentados por microbiota proveniente del individuo 5. Concentración (mM) vs tiempo (horas).

Los resultados obtenidos en los ensayos de fermentación de este individuo evidenciaron que, para la producción de ácido acético, el kefiran fue la fibra que más la impulsó. En el caso del ácido propiónico, se pudo observar que el dextrano fue el polisacárido que generó el mayor incremento en su producción, mientras que la mayor producción de ácido butírico se encontró en el medio conteniendo kefiran.

Respecto a la producción de ácido butírico, pudo observarse que solo el kefiran y los β -glucanos pudieron generar aumentos significativos de este metabolito.

Comparación de resultados

De acuerdo con los resultados obtenidos en las fermentaciones, pudo observarse que para cada ácido y para cada individuo, hubo algún polisacárido que fue más eficiente que otro para ser fermentado por parte de los microorganismos presentes en la materia fecal (Tabla 5).

Tabla 5: Polisacáridos que indujeron la mayor producción de cada ácido para cada individuo estudiado.

Individuo	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico
1	Dextrano	Dextrano	Dextrano
2	Dextrano	Dextrano	β -glucanos
3	Kefiran	Kefiran	Kefiran
4	Kefiran	β -glucanos	β -glucanos
5	Kefiran	Dextrano	Kefiran

De acuerdo con los resultados presentados correspondientes a los ensayos de fermentación, pudo evidenciarse, en todos los casos, la acidificación del medio de cultivo tras el agregado de las distintas fuentes de carbohidratos a los tiempos de 24 hs y 48 hs sugiriendo, de esta manera la producción de ácidos como producto de una fermentación por parte de la microbiota presente en las muestras de materia fecal.

Por otro lado, luego de las fermentaciones de los medios con glucosa como única fuente de carbohidratos, se pudo comprobar la producción de los tres metabolitos esperados para este proceso: ácidos acético, propiónico y butírico. Asimismo, se evidenció que por el solo hecho de utilizar este azúcar simple, las concentraciones de los ácidos variaron entre individuos para los dos tiempos de incubación evaluados. De este modo, se comprobó que la respuesta de la microbiota proveniente de materia fecal de distintos individuos no siempre responde de la misma manera. Esto está en concordancia con lo encontrado por otros autores (Hamet *et al.*, 2016; Medrano *et al.*, 2020).

La determinación de ácidos mediante cromatografía gaseosa permitió revelar que, en cada medio de cultivo con microbiota proveniente de cada individuo, se produjeron distintas concentraciones de ácidos orgánicos que difirieron también según la fibra que se había agregado como fuente de carbono. Gracias a estos resultados, se puede apreciar la importancia y la presencia de una variabilidad interindividual en la capacidad de fermentación de distintas fuentes de carbono. Esto quiere decir que un mismo polisacárido puede generar distintos tipos de respuesta en la microbiota de cada uno de los individuos que la consuman.

De modo interesante, se encontró que estos polisacáridos fueron capaces de incrementar la producción de ácido butírico en los individuos, indicando que es posible inducir la producción de este ácido, si se ingiere la fibra adecuada (Zhang *et al.*, 2021).

Estos resultados permiten aportar y confirmar la evidencia científica que se encuentra postulada por diversos autores sobre la fermentabilidad y la acción prebiótica de los polisacáridos en estudio.

Para el kefirán, se pudo observar por parte de la microbiota una respuesta en 3 de los 5 individuos incluidos en el presente trabajo, siendo el incremento de la producción de ácidos

más evidente a las 48 horas de fermentación. Estos resultados concuerdan con la actividad prebiótica del kefirán descrita por Medrano *et al.*, (2022). En el trabajo citado pudo demostrarse la capacidad de este polisacárido de modular la población microbiana con la consecuente formación de ácidos. De modo interesante, el kefirán indujo un incremento en la producción de ácido butírico cuando los medios fueron fermentados por microbiota del individuo con antecedentes de cáncer de colon (individuo 3) y del individuo con sospecha de colitis ulcerosa (individuo 5). Si bien son necesarios más estudios que incluyan un análisis del microbioma para confirmarlo, lo hallado indicaría que podría postularse al kefirán como una fibra que potencialmente podría mejorar o revertir el estado de disbiosis de algunos individuos. Por su parte, los β -glucanos evaluados en este trabajo, también fueron capaces de ser utilizados como sustrato fermentable por parte de las bacterias presentes en la materia fecal de los individuos incluidos en este estudio. En dos de los cinco individuos, los medios conteniendo β -glucanos fueron los que presentaron mayores concentraciones de ácido butírico. Los individuos cuyas microbiotas respondieron mejor a este polisacárido fueron el individuo con antecedentes de pólipos intestinales (individuo 2) y el individuo con diagnóstico confirmado de colitis ulcerosa (individuo 4).

La actividad prebiótica de β -glucanos obtenidos de paredes de levaduras fue estudiada por Chaikliang *et al.*, (2015), quienes comprobaron el favorecimiento en el desarrollo de bacterias benéficas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, productores de ácidos orgánicos con la inclusión de estos polisacáridos.

Finalmente, con respecto al dextrano, se pudo observar que es un polisacárido fermentable por bacterias intestinales. De modo interesante, únicamente las bacterias presentes en la materia fecal del individuo sin patología (individuo 1) fueron capaces de producir los tres ácidos en altas concentraciones utilizando este polisacárido como fuente fermentable; además, para este individuo, se encontró que el dextrano fue el que generó la mayor concentración de ácido butírico. Esto podría indicar que este polisacárido de alto peso molecular e insoluble podría ser utilizado por microorganismos presentes en ecosistemas cuya diversidad no se encuentre alterada (*eubiosis*), aunque son necesarios más estudios para confirmarlo.

Un estudio reciente efectuado por Tan *et al.*, (2022), demostró la capacidad de los polisacáridos sintetizados por una cepa de *L. satsumensis* aislada de granulo de kefir de agua, de inducir el crecimiento de bacterias intestinales productoras de ácidos orgánicos.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la variabilidad intra e interindividual en la fermentabilidad de distintas fibras dietarias no digeribles siendo una más favorable que otra en cuanto a la producción de ácidos orgánicos para cada individuo, especialmente, en la producción de butirato. De esta manera, estos resultados refuerzan aún más el potencial de las intervenciones dietarias personalizadas.

4.4. Ensayo de actividad biológica: viabilidad celular

Con el objetivo de estudiar la actividad biológica de los ácidos orgánicos presentes en los medios fermentados (lo cual simula lo que ocurriría en el colon), y a partir de los resultados obtenidos en la cuantificación mediante cromatografía gaseosa, se seleccionaron las condiciones de mayor producción de ácido butírico para cada individuo. A partir de las mismas, se prepararon soluciones que contenían de los tres ácidos (acético, propiónico y butírico) en las concentraciones correspondientes a las condiciones seleccionadas (Tabla 6). Las mismas se prepararon en el medio de cultivo rutinario de las células eucariotas (DMEM).

Las células Caco-2/TC7 crecidas durante 48 horas en la placa, (con 50 % de confluencia), fueron lavadas con PBS y a continuación se agregaron las soluciones de ácidos preparadas según lo indicado anteriormente (Tabla 6). Se incluyó un control conteniendo concentraciones crecientes de ácido butírico (0, 2,5, 5 y 10 mM), para evaluar el daño provocado por el ácido. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C en estufa con 5 % de CO₂. Pasado este tiempo, se extrajeron los sobrenadantes de cada fosa y se agregaron 500 µL de la solución de azul tripán. Inmediatamente después, se observó en microscopio óptico invertido, y se cuantificó el número de células por campo 40X teñidas (dañadas), obteniendo los datos de la Tabla 6.

Tabla 6: Conteo promedio de las células dañadas por campo en fosas adicionadas con ácidos correspondientes a las concentraciones de ácidos seleccionadas para cada individuo. Se especifican, asimismo, la patología del paciente, la condición de ácidos orgánicos y la fibra generadora de los mismos. Número promedio de células por campo 40X: 312 células.

Individuo	Patología	Concentración de ácidos para tratamiento	Fibra fermentable utilizada	Promedio de células dañadas por campo	Porcentaje de células dañadas por campo
Individuo 1	Sin patología	Acético: 15,65 mM Propiónico: 5,33 mM Butírico: 5,11 mM	Dextrano	7	2%
Individuo 2	Pólipos intestinales	Acético: 5,36 mM Propiónico: 2,86 mM Butírico: 3,07 mM	β-glucanos	7	2%
Individuo 3	Cáncer colorrectal	Acético: 16,75 mM Propiónico: 2,11 mM Butírico: 2,05 mM	Kefiran	8	2%
Individuo 4	Colitis ulcerosa	Acético: 9,96 mM Propiónico: 4,01mM Butírico: 4,09 mM	β-glucanos	14	4%
Individuo 5	Colitis Ulcerosa	Acético: 13,76 mM Propiónico: 4,24 mM Butírico: 3,27 mM	Kefiran	10	3%

Según puede observarse en la tabla, el número de células dañadas por campo representó menos del 4 % del número total de células. Es importante resaltar que la línea celular utilizada (Caco-2/TC7), si bien es una línea proveniente de un adenocarcinoma de colon, no se encuentra dentro de las líneas celulares provenientes de metástasis más agresivas, como sí ocurre con otras líneas como HT-29 (Scharlau *et al.*, 2009). La baja incidencia del efecto del ácido butírico podría

explicarse por este motivo, ya que está demostrado que el mismo posee un efecto benéfico para enterocitos normales mientras que induce la muerte en enterocitos neoplásicos (Donohoe *et al.*, 2012).

El efecto de diferentes concentraciones de ácido butírico en células Caco-2/TC7 se muestra en la Figura 37. En este caso, puede observarse que la mayor concentración ensayada (10 mM) indujo un promedio de 34 células dañadas por campo lo que representa un porcentaje del 10%. Si bien pudo observarse que los aumentos de concentración del butirato generaron una mayor cantidad de células dañadas, evidenciando un efecto dependiente de la dosis, este efecto no fue pronunciado. En trabajos previos en los cuales se evaluó el efecto del ácido butírico en células HT-29 se encontró que concentraciones bajas de este ácido (2,3 mM) indujeron la muerte del 60 % de las células de la fosa, en evaluaciones mediante tinción con yoduro de propidio (Medrano *et al.*, 2020).

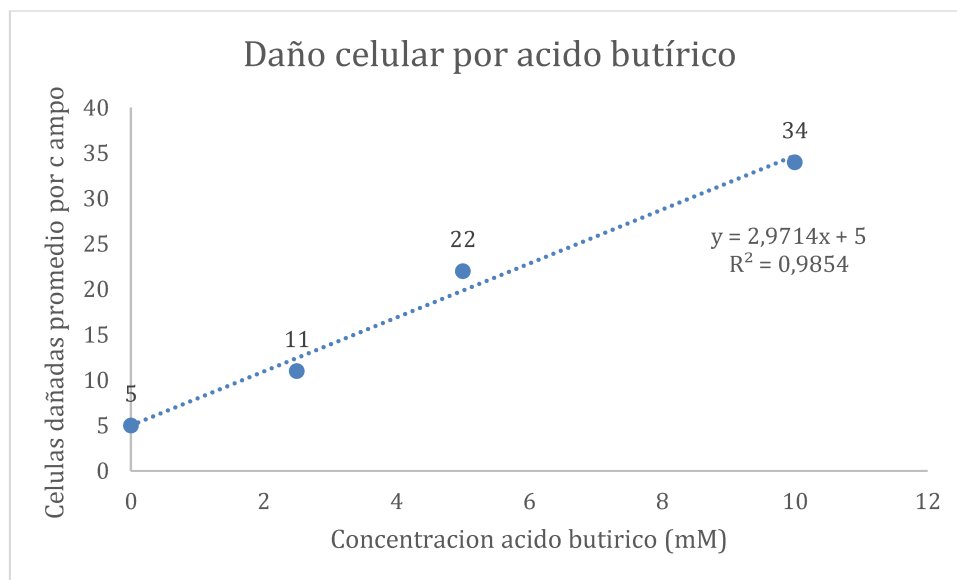


Figura 37: Comportamiento del daño celular en las células Caco-2/TC7 en función de la concentración de ácido butírico agregado. Se presenta células dañadas promedio por campo vs concentración de ácido butírico (mM), ecuación de la recta y coeficiente de regresión (R^2).

Los resultados obtenidos luego de la evaluación de la actividad mitocondrial están en concordancia con los resultados de viabilidad. El efecto de los medios simulados conteniendo los ácidos, no generó un efecto en la actividad mitocondrial de las células, como así tampoco lo generó el ácido butírico en la mayor concentración estudiada (10 mM) (datos no mostrados). Por lo tanto, en las condiciones ensayadas, los ácidos generados no produjeron daño en células de la línea Caco-2/TC7, quedando como perspectiva la comparación con una línea celular proveniente de una neoplasia más agresiva como es la línea celular HT-29 (Scharlau *et al.*, 2009).

5. Conclusiones

En el presente trabajo se demostró que a partir de subproductos de la industria alimentaria (como crema de levaduras cerveceras o de biomasa sub-aprovechada proveniente de gránulos de kefir de leche y de agua) se pueden aislar polisacáridos con un grado de pureza aceptable, utilizando protocolos sencillos y amigables con el ambiente. Los polisacáridos obtenidos mediante estas metodologías pudieron caracterizarse, demostrando ser de un alto peso molecular y presentando una composición coincidente con datos bibliográficos.

Se demostró que estos polisacáridos pueden ser utilizados como fuente de carbohidratos por bacterias presentes en materia fecal de individuos con diferentes patologías intestinales de origen inflamatorio, así como en la de un individuo sin patología. Se comprobó al mismo tiempo que la respuesta de la microbiota frente a la administración de un mismo polisacárido puede ser diferente entre individuos. La respuesta de la microbiota intestinal está ligada a las características fisicoquímicas de los polisacáridos administrados, por lo que sería esperable que la administración de distintas fibras, pueda llegar a brindar respuestas diferenciales siendo una más favorable que otra en cuanto a la producción de ácidos orgánicos, especialmente de butirato, reforzando el potencial de las intervenciones dietarias personalizadas.

Con respecto a los ensayos *in vitro*, si bien no se pudo observar efecto del ácido butírico en la viabilidad de los enterocitos de la línea Caco-2/TC7, estos resultados están en línea con lo encontrado por otros autores, ya que el butirato posee un efecto diferencial en enterocitos normales y neoplásicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo final constituyen un aporte a la aplicación de biopolímeros obtenidos de fuentes naturales para ser incorporados en alimentos funcionales con un beneficio en la salud del consumidor.

Asimismo, este trabajo establece un sustento para avanzar en el estudio de la degradación de los polisacáridos en el tracto gastrointestinal por la acción de bacterias, en particular en el colon, ampliando el número de muestras (donantes con patologías y donantes sin patologías), y evaluar las poblaciones microbianas favorecidas por el consumo de estas fibras mediante secuenciación y estudio de poblaciones microbianas.

6. Bibliografía

- Aguirre, M, Ramiro-García, J, Koenen, M, Venema, K (2014). To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for invitro fermentation studies. *J Microbiol Met*, 107,1-7.
- Arumugam, M, Raes, J, Pelletier, E, Le Paslier, D, Yamada, T, Mende, DR, et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180
- Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Frassanito, A. M., & Gualtieri, P. (2011). Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. *Natural product reports*, 28(3), 457-466.
- Brodtkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... & Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.
- Caruso, A, Maria, Piermaria, J, Abraham, A, Medrano, M. (2020) β -glucans obtained from beer spent yeasts as functional food grade additive: Focus on biological activity. *Food Hydrocolloids* 133 (2022) 107963.
- Calatayud, M., Börner, R.A., Ghyselinck, J., Verstrepen, L., Medts, J.D., Abbeele, P.V.D., Boulgange, C.L., Priour, S., Marzorati, M., Damak, S., 2021. Water kefir and derived pasteurized beverages modulate gut microbiota, intestinal permeability and cytokine production in vitro. *Nutrients* 13 (11), 3897
- Chaikiang, C., Wichienchot, S., Youravoug, W., & Graidist, P. (2015). Evaluation on prebiotic properties of β -glucan and oligo- β -glucan from mushrooms by human fecal microbiota in fecal batch culture. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(11), 395-405.
- Chen, J., & Vitetta, L. (2018). Inflammation-modulating effect of butyrate in the prevention of colon cancer by dietary fiber. *Clinical colorectal cancer*, 17(3), e541-e544.
- 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.
- Collins, S. M., Gibson, G. R., Kennedy, O. B., Walton, G., Rowland, I., & Commane, D. M. (2021). Development of a prebiotic blend to influence in vitro fermentation effects, with a focus on propionate, in the gut. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(8), fiab101
- Coma, M.E., Peltzer, M.A., Delgado, J.F., y Salvay, A.G. (2019). Water ker grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on lm properties. *Eur. Polym. J.* 120: 109234.
- Conrad, R, Vlassov, A (2015). The Human Microbiota: Composition, Functions, and Therapeutic Potential. *Med Sci Rev*, 2015; 2: 92-103.
- Donohoe, DR, Curry, KP, Bultman, SJ (2013). Microbial oncotarget: bacterial-produced butyrate, chemoprevention and Warburg effect. *Oncotarget*, 4(2), 182.
- 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.
- de Paiva, I.M., da Silva Steinberg, R., Lula, I.S., de Souza-Fagundes, E.M., de Oliveira Mendes, T., Bell, M.J.V., et al. (2016). *Lactobacillus kefirifaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. *LWT - Food Sci. Technol.* 72: 390–398
- Exarhopoulos, S., Goulas, A., & Dimitreli, G. (2022). Biodegradable Films from Kefiran-Based Cryogel Systems. *Macromol*, 2(3), 324-345.
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate polymers*, 189, 296-303.
- Freitas, F., Alves, V.D., y Reis, M.A.M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 29: 388–398.
- Gagliarini, N., Diosma, G., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & Piermaria, J. (2019). Whey protein-kefir films as driver of probiotics to the gut. *LWT*, 105, 321-328.
- Gao, Z, Guo, B, Gao, R, Zhu, Q, Qin, H (2015). Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, 6, 20.
- Ghosh, T. S., Shanahan, F., & O'Toole, P. W. (2022). The gut microbiome as a modulator of healthy ageing. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 19(9), 565-584
- Gibson, GR, Roberfroid, MB (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- 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.
- Ghosh, T. S., Shanahan, F., & O'Toole, P. W. (2022). The gut microbiome as a modulator of healthy ageing. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 19(9), 565-584.
- Hamet, M. F., Londero, A., Medrano, M., Vercaemmen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G. L., ... & Abraham, A. G. (2013). Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food microbiology*, 36(2), 327-334.
- Hermann, M., Kronseder, K., Sorgend, J., Ua-Arak, T., Vogel, R., 2016. Functional properties of water kefir and its use as a hydrocolloid in baking. *Eur. Food Res. Technol.* 242 (3), 337–344
- Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*, 8(2), 172-184.
- Iraporda C. 2010. Tesina de grado. Caracterización química y microbiológica de gránulos de kefir de agua y su producto fermentado. FCE, UNLP.
- Iraporda, C, Errea, A, Romanin, DE, Cayet, D, Pereyra, E, Pignataro, O, et al. (2015). Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, 220(10), 1161-1169.

- Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefir, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7(2), 200-211.
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 19(1), 29-41.
- Matamoros, S, Gras-Leguen, C, Le Vacon, F, Potel, G, de La Cochetiere, MF (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*, 21(4), 167-173.
- Medrano, M. (2010). Tesis doctoral. Caracterización Funcional del polisacárido de kefir. Estudios in vitro e in vivo. FCE, UNLP:
- Medrano, M, Hamet, MF, Abraham, AG, Pérez, PF (2009). Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(4), 505.
- Medrano, M, Gangoiti, M, Simonelli, N, Abraham, A (2020) Kefiran fermentation by human faecal microbiota: Organic acids production and in vitro biological activity. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*, 24, 100229.
- Miller F., Judith A. Piermaria, Micaela Medrano (2019) APLICACIÓN DE BETA-GLUCANOS OBTENIDOS A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA CERVECERA. Resumen presentado a Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. Florencio Varela, 2 al 4 de diciembre de 2019.
- Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G. Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., & Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 140(2), 197-208.
- Pastor, D. (2015). Tesina de grado. Efecto del kefir en el crecimiento y metabolismo de la microbiota recuperada de barros fecales de origen humano. FCE, UNLP.
- Patel, S, Goyal, A (2012). The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*, 2(2), 115-125
- Peltzer, M. A., Salvay, A. G., Delgado, J. F., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2018). Use of residual yeast cell wall for new biobased materials production: Effect of plasticization on film properties. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1995-2007.
- Pengkumsri, N, Sivamaruthi, BS, Sirilun, S, Peerajan, S, Kesika, P, Chaiyasut, K, et al. (2017). Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology*, 37(1), 124-130.
- Pidoux, M., Brillouet, J. M., & Quemener, B. (1988). Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnology letters*, 10, 415-420.
- Piermaria (2008). Tesis Doctoral. Polisacáridos de bacterias lácticas: su aplicación en alimentos funcionales. FCE, UNLP:
- Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2009). Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food hydrocolloids*, 23(3), 684-690.
- Piermaria, J., Bengoechea, C., Abraham, A. G., & Guerrero, A. (2016). Shear and extensional properties of kefir. *Carbohydrate polymers*, 152, 97-104.
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M.A., & Abraham, A.G.(2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1261-1269.
- Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., & Abraham, A. (2015). Edible kefir films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 193-199.
- Piermaria, J., López-Castejón, M. L., Bengoechea, C., Guerrero, A., & Abraham, A. G. (2020). Prebiotic emulsions stabilised by whey protein and kefir. *International Journal of Food Science & Technology*.
- Piermaria, JA, La Canal, M, Abraham, AG (2008). Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1520-1527.
- Rachwał, K., Wańsko, A., Gustaw, K., & Polak-Berecka, M. (2020). Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ*, 8. Article e9427.
- Rau, M., Rehman, A., Dittrich, M., Groen, A. K., Hermanns, H. M., Seyfried, F., Beyersdorf, N., Dandekar, T., Rosenstiel, P., & Geier, A. (2018). Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease. *United European Gastroenterology Journal*, 6(10), 1496–1507.
- Rezasoltani, S., Aghdaei, H. A., Dabiri, H., Sepahi, A. A., Modarressi, M. H., & Mojarad, E. N. (2018). The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microbial pathogenesis*, 124, 244-249.
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2003). Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Le Lait*, 83(1), 79-87.
- 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(10), 605-616.
- Sarbini, S., Kolida, S., Naeye, T., Einerhand, A., Gibson, G., y Rastall, R. (2013). prebiotic effect of a-1,2 branched, low molecular weight dextran in the batch and continuous faecal fermentation system. *J. Funct. Foods* 5: 1938–1946
- Scott, KP, Martin, JC, Duncan, SH, Flint, HJ (2014). Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS microbiology ecology*, 87(1), 30-40.
- Scharlau, D.; Borowicki, A.; Habermann, N.; Hofmann, T.; Klenow, S.; Miene, C.; Munjal, U.; Stein, K.; Gleis, M. (2009). Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research* 682 (1): 59-63.
- Singh, V., Ryu, Y. C., & Unno, T. (2021). Dietary Intervention Induced Distinct Repercussions in Response to the Individual Gut Microbiota as Demonstrated by the In Vitro Fecal Fermentation of Beef. *Applied Sciences*, 11(15), 6841

- Tan, L. L., Ngiam, J. J., Sim, E. S. Z., Conway, P. L., & Loo, S. C. J. (2022). Liquorilactobacillus satsumensis from water kefir yields α -glucan polysaccharides with prebiotic and synbiotic qualities. *Carbohydrate Polymers*, 290, 119515.
- Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T., & Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(1), 21–29.
- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006). Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36(5-6), 254-260.
- 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(12), 10386-10396.
- Weir, TL, Manter, DK, Sheflin, AM, Barnett, BA, Heuberger, AL, Ryan, EP (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PloS one*, 8(8), e70803.
- 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.
- Zhang, M., Wang, Y., Zhao, X., Liu, C., Wang, B., & Zhou, J. (2021). Mechanistic basis and preliminary practice of butyric acid and butyrate sodium to mitigate gut inflammatory diseases: a comprehensive review. *Nutrition Research*, 95, 1-18.
- Zweig, G. y Sherma, J. (1978) Handbook Series in Chromatography, Section A: General Data and Principles Vol.II, CRC press inc., Florida, USA, pp.: 124-130.