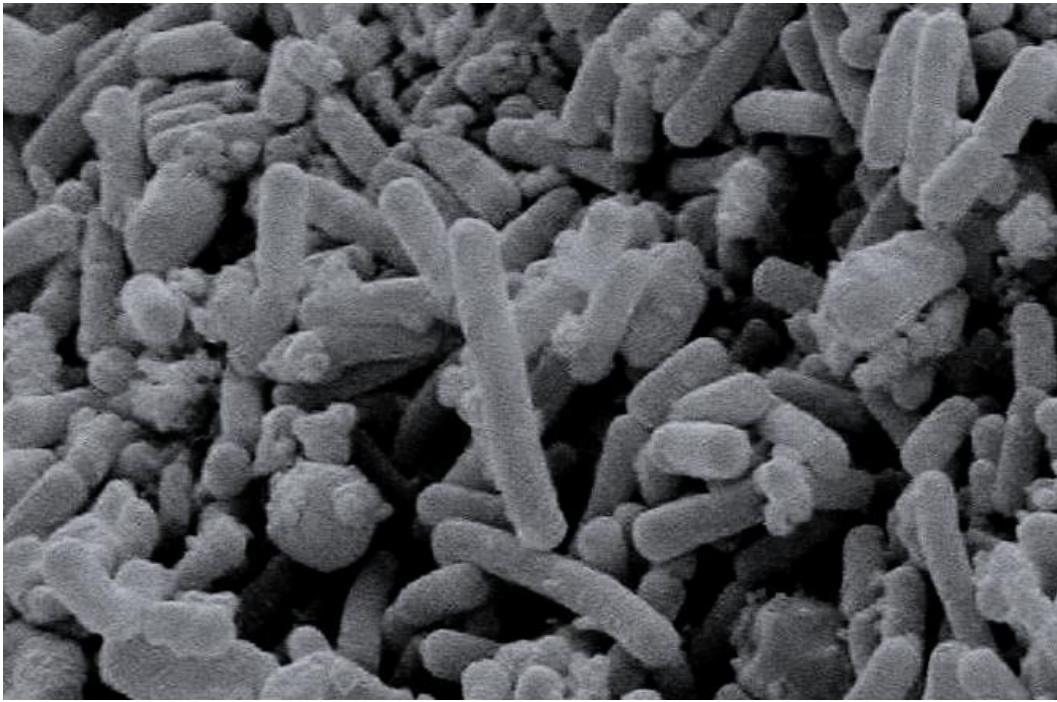


## Capítulo 3: Efecto de polisacáridos bacterianos sobre el balance de la microbiota intestinal de ratones.



## Introducción

### 1.- Composición de la microbiota intestinal humana

El tracto gastrointestinal humano (Figura 1) está formado por una serie de órganos que se encuentran colonizados en distinta medida por una colección compleja de microorganismos, a ésta se la denomina microbiota y es específica para cada individuo.

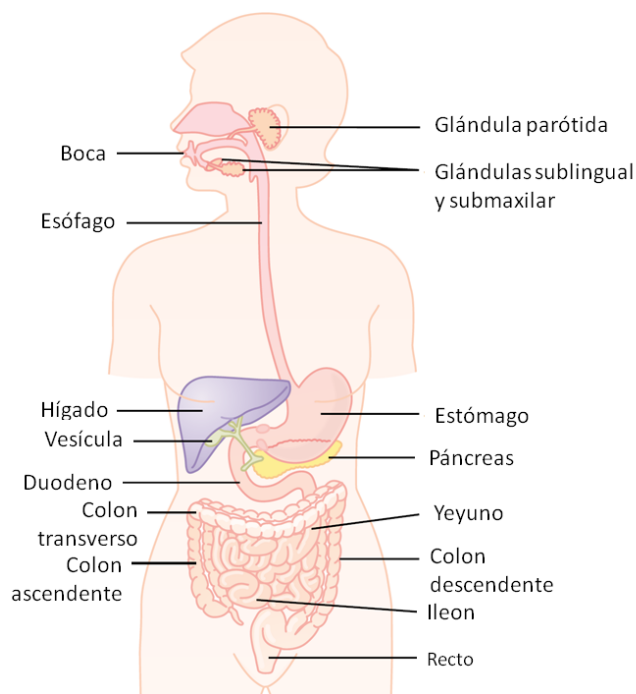


Figura 1: Esquema del tracto gastrointestinal humano.

La cantidad y composición de las bacterias varían mucho a lo largo del tracto gastrointestinal humano. El estómago y el intestino delgado contienen un bajo número de especies bacterianas adheridas al epitelio y algunas otras en tránsito (un máximo de  $10^4$  microorganismos por mililitro de contenido gástrico o intestinal (Tannock, 1995). La escases de bacterias en el tracto

superior se debe a la composición del medio luminal (ácido, bilis y secreción pancreática) y a la actividad propulsiva motora que impide la colonización estable de bacterias en el lumen. En contraste, el intestino grueso es el ecosistema microbiano más intensamente poblado, alberga cientos de especies (Guarner & Malagelada, 2003) con un contenido total de entre  $10^{11}$  y  $10^{12}$  bacterias por gramo (Simon & Gorbach, 1984).

La variabilidad y diversidad de este ecosistema bacteriano dificulta su estudio. Los géneros típicamente encontrados en la microbiota intestinal humana son *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* y *Clostridium* (Green *et al* 2006), además hay resultados que indican que las bacterias anaerobias superan en número a las aeróbicas en un factor de entre 100-1000. Los géneros, *Bacteroides*, *Eubacterias*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, y *Ruminococcus* son predominantes en el ser humano, y *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus*, etc, son géneros subdominantes (Salminen *et al*, 1998). A su vez, cada individuo posee varios cientos de especies que pertenecen a estos géneros, con una combinación particular de especies predominantes específica para cada individuo.

## **1.2.- Función de la microbiota intestinal.**

El intestino actúa como interface entre la alimentación y todas las demás funciones del organismo.

El desarrollo de la microbiota intestinal proporciona las bases para el mantenimiento de la barrera intestinal, que impide que las bacterias patógenas invadan el tracto gastrointestinal, pasen a la sangre que por él circula, y por ende se distribuyan por el organismo. El equilibrio de la microbiota intestinal, junto con el sistema inmunitario del propio intestino es fundamental para que

las bacterias residentes cumplan una función protectora, en especial contra la proliferación de agentes patógenos (ILCI).

Además, cumple funciones metabólicas fermentando algunos sustratos provenientes de la dieta (hidratos de carbono, proteínas) que no fueron digeridos en el intestino delgado, y se encuentran disponibles para la fermentación por la microbiota colónica o provenientes de fuentes endógenas tales como mucinas (glicoproteína mayoritaria componente de la mucosa que recubre la pared del tracto gastrointestinal) (Rowland *et al.*, 1985). Los carbohidratos exógenos complejos que pueden servir como sustrato fermentables por los microorganismos intestinales se detallan en la Tabla 1 (Tannock, 1995)

Tabla 1: Carbohidratos complejos presentes en el colón humano (Tannock, 1995).

Fuente	Tipo de hidrato de carbono
Material estructural de plantas	Celulosa Laminarina Xilanos Arabinogalactanos Pectinas
Aditivos alimenticios	Goma Guar Goma arábica Alginatos
Vegetales, harinas	Amilosa Amilopectinas
Células	Mucopolisacáridos
Mucus	Mucinas

En un adulto típico, aproximadamente 80 g del total de alimentos consumidos por día se encuentra disponible para ser fermentado por la microbiota intestinal. Los dos tipos de fermentación que se llevan a cabo en el intestino son sacarolítica y proteolítica. Se considera que una microbiota equilibrada debe contener un mayor número de microorganismos sacarolíticos dentro de los que encontramos a bifidobacterias y lactobacilos. Como productos finales de la fermentación sacarolítica se obtienen ácidos grasos de

cadena corta. Estos cumplen una importante función en los colonocitos ya que contribuyen a regular el metabolismo de lípidos y azúcares y disminuyen levemente el pH intestinal lo que contribuye a la exclusión de patógenos (Ruas-Madiedo *et al.*, 2007). La fermentación proteolítica genera además componentes fenólicos, aminos, amonio, que resultan tóxicos para el individuo (Scantlebury *et al.*, 2004). Otras funciones metabólicas son las de síntesis de vitaminas (Hill, 1997) y absorción de iones como calcio, hierro y magnesio (Roberfroid *et al.*, 1995).

Finalmente, la microbiota colónica influye sobre las características de las heces, tales como el peso, la consistencia, la frecuencia y el tiempo de tránsito intestinal total, propiedades que son quizá los marcadores más fiables de la función colónica en general (ILCI).

### **1.3.- Componentes benéficos de la microbiota intestinal**

La microbiota intestinal influye en el estado fisiológico, bioquímico e inmunológico de los animales, incluidos los humanos. Por lo tanto, modificaciones en la actividad bacteriana intestinal podría promover el estado general de salud en humanos o bien ser usado para la profilaxis o tratamiento de enfermedades específicas (Snart *et al.*, 2006).

En el intestino, ciertas bacterias están asociadas a la formación de toxinas y resultan patogénicas cuando son dominantes, o bien están relacionadas a la formación de moléculas carcinogénicas. Estas especies potencialmente dañinas están asociadas a grupos tales como clostridios y bacteroides. Otra parte de la población bacteriana intestinal es considerada microbiota potencialmente promotoras de la salud. Este concepto se basa en que no contienen agentes patógenos conocidos, no producen toxinas, producen defensinas, sintetizan vitaminas y son bacterias fermentadoras de hidratos de carbono cuyos productos finales mayoritarios de la fermentación son ácidos

grasos de cadena corta (AGCC) (especialmente, acetato, propionato y butirato los cuales pueden ser metabolizados para proveer de energía al huésped). Estos microorganismos pueden también inhibir a patógenos a través de múltiples mecanismos por ejemplo compitiendo con los patógenos por sitios receptores en la pared del intestino o bien por los nutrientes. Además, la pared celular de los microorganismos potencialmente benéficos está desprovista de mediadores inflamatorios (Especialmente Gram positivas), (Cummings *et al.*, 2004, Roberfroid *et al.*, 2010). Dentro de esta población encontramos principalmente a bifidobacterias y lactobacilos.

Los efectos de los lactobacilos en la salud humana incluyen la capacidad de mejorar la digestión de la lactosa en individuos intolerantes a la lactosa, reducir la constipación y la diarrea infantil, ayudar en infecciones resistentes como salmonelosis, prevenir la diarrea del viajero, y ayudar en el síndrome de colon irritable (Salminen *et al.*, 1998). En cuanto a las bifidobacterias, tienen la capacidad de estimular el sistema inmune, producir vitamina B, inhibir el crecimiento de patógenos, reducir el nivel de amonio y colesterol en sangre, y ayudar a restablecer la flora intestinal luego de un tratamiento con antibióticos (Gibson & Roberfroid, 1995).

#### **1.4.- El concepto de prebiótico**

Yazawa *et al* (1978) y Mitsuoka *et al* (1987) fueron los primeros en demostrar que algunos polisacáridos no digeribles (especialmente fructo-oligosacáridos) eran capaces de ser fermentados por bifidobacterias y producían el aumento del volumen de las heces humanas luego de ser ingeridos. Estas observaciones fueron estudiadas y confirmadas por Gibson & Roberfroid (1995) quienes introdujeron el concepto de prebiótico. Éste fue evolucionando y en el año 2008, la *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) presentó la siguiente definición: “Un

prebiótico es un componente alimenticio que puede ser fermentado selectivamente, resultando en cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal y produce beneficios en la salud”. Quedando claro que dichos cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal implican una inducción en los efectos fisiológicos benéficos no solo en el colon sino también en todo el organismo y/o una reducción del riesgo de contraer enfermedades intestinales y sistémicas. Estos posibles efectos fueron detallados por Roberfroid *et al.* (2010) e incluyen:

- Mejora y/o estabilización de composición la microbiota intestinal.
- Mejora en las funciones intestinales (consistencia, regularidad y volumen de las heces).
- Aumento en la absorción de minerales y mejora en la salud ósea (contenido de Calcio en huesos, densidad mineral ósea).
- Modulación de la producción de péptidos gastrointestinales, energía metabólica y saciedad.
- Iniciación (luego del nacimiento) y regulación/modulación de las funciones inmunológicas.
- Mejora en las funciones de la barrera intestinal, reducción de metabolitos tóxicos.
- Reducción del riesgo de infecciones intestinales.

Además podrían:

- Reducir el riesgo de obesidad, diabetes tipo 2, síndromes metabólicos, etc.
- Reducir el riesgo en inflamaciones intestinales.
- Reducir el riesgo de contraer cáncer de colon.

#### **1.4.1.-Regulación de la microbiota intestinal por la dieta mediante el uso de prebióticos.**

Uno de los factores fundamentales a la hora de controlar la microbiota intestinal es la dieta, por lo tanto, es posible modular su composición a través de los alimentos. Como se mencionó anteriormente, bifidobacterias y lactobacilos son consideradas flora benéfica debido al papel que desempeñan en la microbiota intestinal. Por ésta razón estos grupos de microorganismos suelen ser objeto de intervenciones en la dieta con el objetivo final de mejorar la salud como consecuencia de su proliferación a expensas de bacterias patógenas tales como Bacteroides, clostridia, eubacteria, enterobacteria, enterococci, etc. (Macfarlane *et al.*, 2006).

Esta modulación se puede llevar a cabo mediante la suplementación de la dieta con prebióticos. Tanto oligosacáridos como polisacáridos, pueden ser considerados como candidatos a prebióticos si su estructura química no permite que se absorban en la parte superior del tracto gastrointestinal ni ser hidrolizados por enzimas gástricas, pancreáticas o entéricas humanas. Dentro de los carbohidratos no digeribles podemos encontrar varios compuestos tales como almidones resistentes, polisacáridos de la pared celular de plantas (hemicelulosa), pectinas, gomas y oligosacáridos no digeribles (fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos de soja, glucooligosacáridos). De éstos solo algunos como Inulina, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOSs) y la lactulosa presente en la leche materna, han sido estudiados en lo referente a sus propiedades prebióticas y se ha demostrado su efecto estimulando el desarrollo de microorganismos benéficos como lactobacilos y bifidobacterias (Gibson *et al.*, 1995; Roberfroid *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 1999; Tuohy *et al.* 2001 a y b; Langlands *et al.*, 2004; Van de Wiele *et al.*, 2004; Macfarlane *et al.*, 2006; Haarman & Knol, 2005; Kolida & Gibson, 2007). La mayor parte de los trabajos están dirigidos a estudiar el efecto



prebiótico de la inulina de distintos grados de polimerización (Roberfroid *et al.*, 1997). Snart *et al.*, (2006) han demostrado que el consumo de  $\beta$ -glucanos proveniente de granos de cebada aumenta el contenido de lactobacilos en la microbiota intestinal de ratas alimentadas con una dieta suplementada con este polímero. Biedrzycka *et al.* (2004) muestra el efecto bifidogénico de fructanos, haciendo incapié en la influencia del grado de polimerización sobre el efecto que producen. Así, fructooligosacáridos de cadena corta y oligofruktosas producen mayor efecto en relación a lo observado en inulina de alto grado de polimerización. Se han incorporado a la lista de sustancias prebióticas los componentes de bajo peso molecular del  $\beta$ -glucano (Snart *et al.*, 2006) y la rafinosa (Dinoto *et al.*, 2006 a y b). Van Loo *et al.* (1999) han recopilado información sobre el efecto de oligosacáridos no digeribles sobre la flora intestinal y el hábitat del intestino indicando que existen evidencias que permiten decir que algunos oligosacáridos afectan la absorción de minerales y el metabolismo lipídico y que el producto final del metabolismo de bacterias puede jugar un rol en la prevención del cáncer de colon ya sea directamente o modulando la flora intestinal.

#### **1.4.2.- Exopolisacáridos de bacterias lácticas como prebióticos**

Varios trabajos indican que la capacidad de los EPS bacterianos para ser degradados por la microbiota intestinal depende de la estructura y tipo de uniones que estos polímeros presenten. Los EPS producidos por *Lb. rhamnosus* 9595M-RW no son metabolizados por una suspensión de materia fecal de bebé (Cinquin *et al.*, 2006). Del mismo modo, Ruijssennars *et al.* (Ruijssenaars *et al.*, 2000) analizaron la biodegradabilidad de los EPS producidos por varias cepas de BAL pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*, y encontraron que la susceptibilidad de estos biopolímeros a la degradación biológica en una suspensión fecal varía según la cepa que los produce. Dal Bello

*et al.* (2001) encontraron que los HoPS producidos por *Lactobacillus sanfranciscensis* son metabolizados por la microbiota fecal humana tal como ocurre con inulina, levan o FOS, ampliamente estudiados. Este mismo estudio también se muestra el efecto bifidogénico causado por el HoPS bacteriano y la inulina, pero no con levan y FOS. Korakli *et al.* (2002) demostraron la capacidad del EPS (tipo fructano) producido por *Lactobacillus sanfranciscensis* de ser utilizado como sustrato fermentable *in vitro*. Además, EPS aislados de diferentes bifidobacterias de origen humano pueden actuar como sustrato fermentable para la microbiota intestinal promoviendo un cambio en el perfil de ácidos grasos de cadena corta, y en los perfiles poblacionales de bifidobacterias (Salazar *et al.*, 2008).

Estos resultados sugieren que los EPS bacterianos podrían actuar como sustrato fermentable para la microbiota intestinal, sin embargo son necesarios más estudios que evidencien su potencialidad para ser usado por la flora benéfica y evidencias clínicas de su funcionalidad.

## **2.-Metodologías para el estudio de la microbiota intestinal**

El número total de microorganismos en el tracto intestinal puede ser estimado en  $10^{12}$  bacterias por gramo de contenido intestinal. Cientos de especies bacterianas pueden ser identificadas utilizando métodos tradicionales de cultivo. Sin embargo, el uso de métodos moleculares ha aumentado el conocimiento sobre el número de bacterias en la mucosa y contenido intestinal y sobre la composición de la microbiota intestinal.

Se han utilizado y desarrollado varias metodologías para la valoración de la microbiota intestinal. Estas metodologías pueden ser dependientes o independientes del cultivo de los microorganismos que la componen.

Las metodologías dependientes del cultivo se realizan mediante el cultivo de muestras de materia fecal en medio selectivo (el método clásico

consiste en el cultivo de las muestras fecales en un medio adecuado seguido del aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos) o en medio no selectivo seguido por recuento específico o identificación (Por ejemplo: han sido utilizadas sondas de oligonucleótidos para la identificación y la cuantificación de la microbiota intestinal mediante la hibridación de colonias específicas (Kaufmann *et al.*, 1997; Dore *et al.*, 1998)). La principal desventaja de este tipo de técnicas es que se recuperan solo las especies cultivables en las condiciones de cultivo establecidas, además tienen baja sensibilidad y los ensayos son de larga duración. En relación a esto, Suau *et al.* (1999) mostraron que menos del 25 % de las especies identificadas por métodos moleculares se corresponden con especies conocidas, esto sugiere que la mayoría de las bacterias del intestino grueso no se han descrito todavía y que los métodos clásicos basados en el cultivo de los microorganismos no proporcionan una información precisa sobre de dicha comunidad.

Algunas de las metodologías cualitativa independientes del cultivo permiten evaluar las especies predominantes de la microbiota intestinal. Estas incluyen el uso de oligonucleótidos específicos para PCR, sondas para hibridación, análisis de secuencias de genes amplificados del ARNr 16S, análisis de genes que codifican para el ARNr 16S por DGGE-TGGE, análisis de patrones de fragmentos restricción terminales y oligonucleótidos *arrays*. Se puede destacar que la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de amplicones del rADN y ARNr 16S fecal es una de las metodologías más importantes para el estudio y monitoreo de comunidades bacterianas en heces (Zoetendal *et al.*, 1998; Zoetendal *et al.*, 2001). Tannock *et al.* (2004) utilizaron PCR-DGGE para estudiar las poblaciones de bifidobacterias en materia fecal de humanos que ingirieron GOS en relación a un grupo control. Ellos enumeraron desventajas en el método tales como el hecho de que es semicuantitativo, difícil de estandarizar, y que no todas las especies resultan representadas en este tipo

de poblaciones complejas. En cuanto a este último inconveniente ellos proponen el uso de oligonucleótidos específicos para especies bacterianas pudiendo así visualizar especies minoritarias. Montesi *et al.* (2005) estudiaron el impacto sobre la microbiota fecal de ratones de la administración oral de prebióticos (FOS) y probióticos mediante PCR-DGGE con oligonucleótidos universales y específicos para bifidobacterias y lactobacilos. Estos autores encontraron una microbiota única para cada ratón y un aumento en el número de bandas de los perfiles electroforéticos del ADN perteneciente al grupo que recibió probióticos en relación al grupo control cuando se analizaron los amplicones obtenidos con oligonucleótidos universales. El uso de oligonucleótidos específicos les permitió detectar un aumento específico del género bifidobacterias en el grupo que recibió prebióticos. Snart *et al.* (2006), estudiaron el efecto de la ingesta de fibras dietarias de distinto origen sobre la microbiota de ratas mediante varias metodologías incluidas PCR-DGGE y destacaron que esta técnica permitió analizar la variabilidad de la flora entre ratones y entre grupos dietarios. Esta metodología es descrita en forma detallada en la introducción del Capítulo 1.

Los métodos cuantitativos independientes del cultivo más ampliamente utilizado son la hibridación fluorescente *in situ* seguido de recuento visual, con analizador de imágenes o mediante citometría de flujo y la PCR en tiempo real.

### **2.1.-Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)- Citometría de flujo**

En la hibridación fluorescente *in situ* se utilizan sondas específicas unidas a fluorocromos que se unen o acoplan a ADN complementario. Las sondas son segmentos de ADN específicos complementarios a la región de interés (Figura 2).

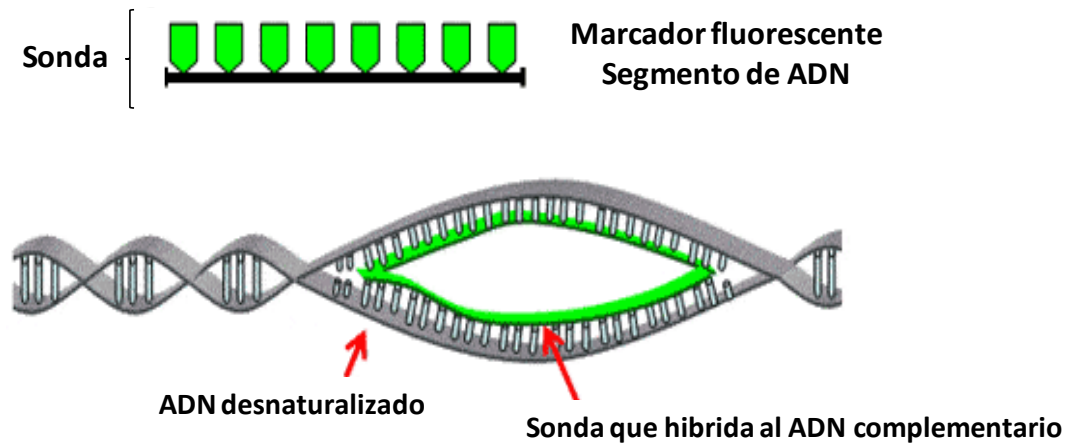


Figura 2: Esquema de la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar múltiples características físicas de partículas individuales en suspensión que son impulsadas por presión positiva a pasar a través de un haz de luz. Estas características se determinan usando un equipo que registra cómo las partículas dispersan la luz laser incidente y emiten fluorescencia.

El equipo está constituido por tres sistemas, un sistema de flujo que transporta las partículas en suspensión hacia el láser; un sistema óptico que consiste en un láser que ilumina las partículas que fluyen en la muestra y un filtro que dirige las señales de luz resultantes hacia los detectores apropiados y finalmente, un sistema electrónico que convierte las señales de luz detectadas en señales electrónicas que son procesados por un ordenador.

En la Figura 3 se muestra un esquema del funcionamiento básico de un citómetro de flujo.

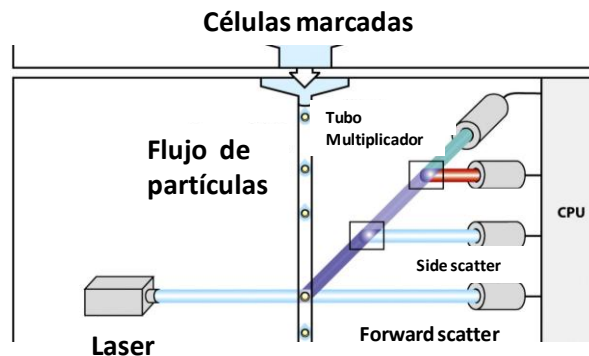


Figura 3: Esquema de un citómetro de flujo (Murphy *et al.*, 2008, *Immunobiology*)

En el citómetro debido al flujo hidrodinámico se genera un ordenamiento de partículas de manera que pasan una a una interceptando el laser produciendo la dispersión de la luz. La luz dispersada hacia delante (*forward scatter*, FSC) es detectada por una lente. La intensidad del FSC está relacionada al tamaño de la partícula y se utiliza para distinguir diferentes tipos de células de restos celulares. La luz dispersada que se detecta en un ángulo de 90° respecto a la excitación se denomina *side scatter* (SSC). El SSC provee información sobre la granularidad o complejidad de una molécula. De esta forma la combinación del FSC y SSC son únicas para cada grupo de partículas y se utilizan para diferenciar células en muestra heterogénea.

Por otro lado, si está presente alguna molécula fluorescente, al ser excitada por el laser, emite fluorescencia. La citometría de flujo usa canales de fluorescencia separadas para detectar la luz emitida permitiendo de acuerdo al equipo, detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. De esta manera analizando la luz dispersada debido a las características propias de la partícula, se seleccionan las poblaciones de trabajo, dentro de la cual uno puede cuantificar aquellas que emiten una fluorescencia específica.

Asociado al equipo se encuentran *sofwards* que permiten separar poblaciones mediante regiones (*gates*), que son características para cada tipo celular (Figura 4a). Si las partículas están marcadas con un solo fluorocromo en general se utilizan gráficos tipo histogramas (Figura 4b). Cuando se utiliza más de un colorante la información se maneja con *dot plots* graficando en cada eje un fluorocromo (Figura 4c).

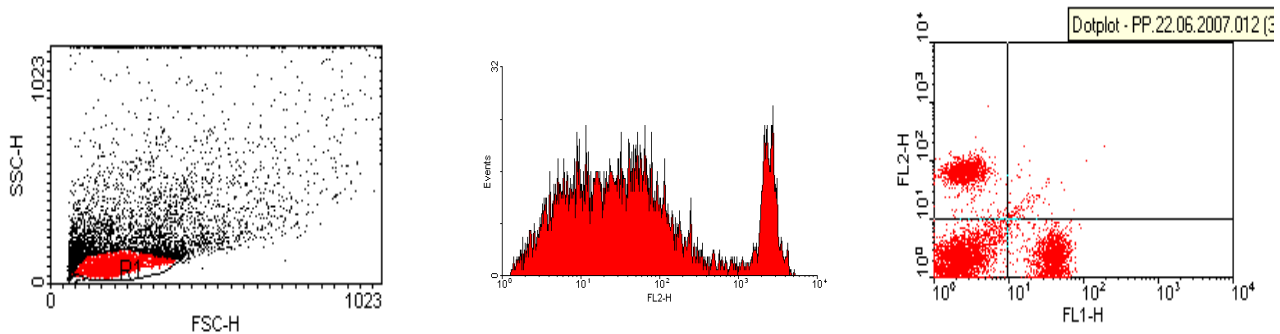


Figura 4: Ejemplo de los datos obtenidos en una citometría de flujo. A: SSC vs FSSC con región R1. B: Histograma con eventos para FL2 en células de R1, C: FL2 vs FL1 en células de R1

La combinación FISH-Citometría de flujo ha sido utilizada para la visualización diferencial de poblaciones bacterianas dentro de muestras complejas como la microbiota intestinal. Kruse *et al.* (1999), Harmsen *et al.* (2002) y Tuohy *et al.* (2001), realizaron estudios en microbiota intestinal humana para estudiar el efecto producido por la ingesta de inulina, durante distintos periodos de tiempo, mediante esta metodología y encontraron un aumento de la población de bifidobacterias. Dinoto *et al.* (2006) estudiaron las poblaciones de bifidobacterias en materia fecal de humanos que consumieron rafinosa durante 4 semanas y encontraron que durante el periodo de administración de rafinosa aumentó el número de este tipo de microorganismos. Al-Tamimi *et al.* (2006) también estudiaron el efecto sobre la

microbiota fecal humana de varios hidrolizados de azúcar de remolacha mediante FISH-Citometría, la que resultó útil para cuantificar las poblaciones de *Bifidobacterium* sp, *Bacteroides* sp, y los subgrupos *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Clostridium histolyticum*. Ellos encontraron que las poblaciones variaron en función del grado de hidrólisis del polímero y que el número de bifidobacterias fue mayor cuanto menor fue el grado de polimerización del polímero ensayado.



## Objetivo General

- ✓ Estudiar *in vivo* el efecto del kefirán y/o de EPS de microorganismos aislados de kefir sobre la microbiota intestinal para su potencial aplicación como prebiótico.

## Objetivos Específicos:

- ✓ Poner a punto el método de PCR-DGGE y la marcación mediante FISH-citometría para el análisis de las poblaciones de eubacterias, lactobacilos y bifidobacterias en muestras fecales.
- ✓ Evaluar cualitativamente y cuantitativamente el efecto provocado por la administración oral de kefirán sobre las poblaciones de eubacterias, lactobacilos y bifidobacterias en la microbiota intestinal en un modelo animal.
- ✓ Evaluar el efecto de la administración oral de polisacáridos producidos por lactobacilos aislados de kefir sobre las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias en la microbiota intestinal de ratones y compararlo con el kefirán.

## Resultados y discusión

### 1.- Efecto de la administración oral de kefirán sobre la microbiota intestinal de ratones.

Para determinar el efecto de la administración oral de kefirán sobre la microbiota intestinal se realizaron experimentos *in vivo* utilizando como modelo ratones Balb C a los que se dividió en tres grupos. A dos de ellos se les administró una dieta base y se le administró kefirán (300mg/l) *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 y 7 días mientras que el otro fue utilizado como control. Los 3 grupos se denominaron de la siguiente manera:

**Grupo control:** recibieron una dieta balanceada durante 7 días.

**Grupo k/2d:** recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de kefirán (300 mg/l) en el agua de bebida durante 2 días.

**Grupo k/7d:** recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de kefirán (300 mg/l) en el agua de bebida durante 7 días.

Con el objetivo de analizar los cambios producidos en la microbiota intestinal de ratones a los que se les administró kefirán se procedió a realizar una evaluación de las comunidades bacterianas en contenido intestinal mediante análisis molecular utilizando PCR y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante químico (DGGE). Esto permite evaluar las poblaciones bacterianas sin diferenciar microorganismos cultivables de no cultivables. Con este fin se utilizó una metodología basada en la amplificación de los genes que codifican la región variable V3 del ARNr 16S. Para ello se tomaron muestras de contenido intestinal a las que se les extrajo el ADN, se amplificó con oligonucleótidos específicos para distintos grupos bacterianos y

la mezcla de fragmentos de ADNr 16S resultante fue separada por electroforesis en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturante de urea/formamida (Figura 5).

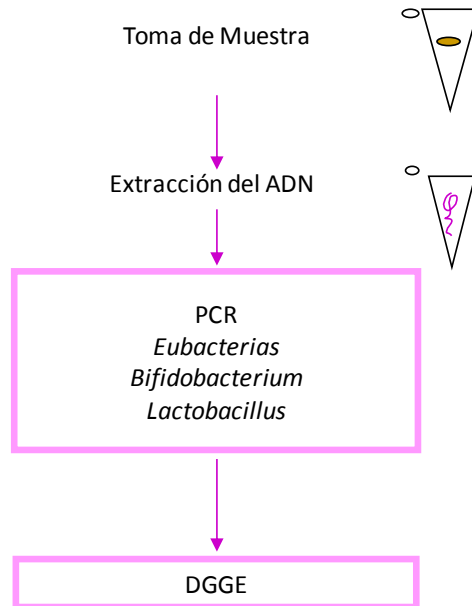


Figura 5: Esquema experimental seguido para evaluar la microbiota intestinal de ratón.

La metodología PCR-DGGE es ampliamente usada para el estudio de muestras complejas provenientes de comunidades microbianas. Sin embargo, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones para obtener resultados reproducibles. Los puntos críticos a considerar se deben tanto a la dificultad para lograr una extracción de ADN reproducible y eficiente (Niemi *et al.*, 2001) como a problemas que se puedan generar en la amplificación. Así, la co-migración de ADN de diferentes especies en la misma banda (Sekiguchi *et al.*, 2001; Speksnijder *et al.*, 2001.), la formación de múltiples bandas como resultado de la amplificación de genes de un solo genoma (Brosius *et al.*, 1981; Nübel *et al.*, 1996), la amplificación diferencial debido a la desnaturización preferencial de genomas con bajo contenido de G- C, la accesibilidad diferencial de los genes de interés dentro del genoma, la interferencia de secuencias

adyacentes y la afinidad selectiva de los oligonucleótidos sintéticos por la secuencia blanco (Farrelly *et al.*, 1995; Suzuki & Giovannoni, 1996; Hansen *et al.*, 1998; Kanagawa, 2003) son algunos de los factores que pueden traer problemas a la hora de interpretar los resultados.

Por lo tanto, para llevar a cabo esta estrategia de análisis fue necesario optimizar las condiciones de amplificación del ADN y las condiciones de la electroforesis.

### **1.1.- Optimización de las condiciones para el análisis mediante PCR-DGGE.**

#### **1.1.1.- Verificación de la especificidad de los oligonucleótidos empleados**

Se utilizaron 3 pares de oligonucleóticos específicos para distintos grupos bacterianos dirigidos a amplificar la región variable V3 del ARNr 16S. Los grupos bacterianos a analizar con los respectivos oligonucleótidos utilizados se detallan a continuación:

- ✓ Eubacterias: oligonucleótidos 518R y 341F-GC que producen amplicones de 193 pb (Muyzer *et al.*, 1993).
- ✓ *Lactobacillus*: oligonucleótidos Lac1 y Lac2-GC que producen amplicones de 327 pb (Walter *et al.*, 2001).
- ✓ *Bifidobacterium*: oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC que producen amplicones de 523 pb (Satokari *et al.*, 2001).

Para la puesta a punto de la técnica se procedió a determinar si los oligonucleótidos elegidos amplificaban solamente el grupo bacteriano al que están dirigidos. Para ello, el ADN extraído de los microorganismos *Saccaromyces cereviceae* CIDCA 812, *Saccharomyces unisporum* CIDCA 81107, *Isatchenquia* CIDCA 9125, *Kluyveromyces lactis* CIDCA B, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, *Bifidobacterium* sp. CIDCA 5320,

*Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332, *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20071, *Lactobacillus parakefir* DSMZ 10551, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lactobacillus plantarum* 337, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactococcus* sp. NZ 9000, *Lactobacillus kefir* ATCC 8007, *Lactobacillus hilgardii* DSMZ 20176, *Propionibacterium acnés* ATCC 11827, *Propionibacterium jensenii* ATCC 4869, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus brevis* JCM 1059, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, fue amplificado con los oligonucleótidos 518R y 341F-GC, Lac1 y Lac2-GC y Bif164F y Bif662-GC utilizando los programas de amplificación y mezclas de reacción descritas por Montesi *et al.*, 2005. Los amplicones resultantes fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Como resultado se observó que la reacción de amplificación llevada a cabo con los oligonucleótidos dirigidos a Eubacterias generó amplicones del tamaño esperado cuando se utilizaron como molde los ADN de todas las bacterias descritas anteriormente. Contrariamente, no se produjo amplificación cuando se usó como molde el ADN proveniente de levaduras. La reacción de amplificación del ADN de los microorganismos ensayados con los oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC generó amplicones de un tamaño entre 500 y 600 pb solamente cuando se utilizó como molde el ADN proveniente de cepas del género *Bifidobacterium*. Finalmente, los oligonucleótidos específicos para *Lactobacillus* resultaron en una amplificación positiva solo en los casos donde el ADN molde provenía de cepas de éste género. Por lo tanto se pudo constatar que los oligonucleótidos seleccionados son específicos para los grupos bacterianos a los que están dirigidos.

En la Figura 6 se muestra, a modo de ejemplo, el perfil electroforético en gel de agarosa (1 % p/v) de los amplicones resultantes de la amplificación, con

oligonucleótidos específicos para la especie *Lactobacillus*, del ADN extraído de las cepas *Saccaromyces cereviceae* CIDCA 812; *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154; *Lactobacillus brevis* 1059; *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348; *Bifidobacterium* sp. CIDCA 5320; *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 332, *Lactobacillus parakefir* DSMZ 10551; *Lactobacillus casei* DSMZ 20011; *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174; *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865. Como se puede observar, sólo el ADN proveniente de cepas del género *Lactobacillus* generaron amplicones del tamaño esperado (entre 300 y 400 pb). Sin embargo, se puede observar que a pesar de haber partido de la misma concentración de ADN molde para todas las cepas, la intensidad de las bandas no es igual en todas. Esto podría deberse a que la accesibilidad de los oligonucleótidos sintéticos por los sitios de unión específico en los genomas no es igual en todos los ADN molde utilizados (de Araújo *et al.*, 2008) y permite inferir que la intensidad de las bandas no está relacionada a la concentración de ADN molde presente en la reacción de amplificación.

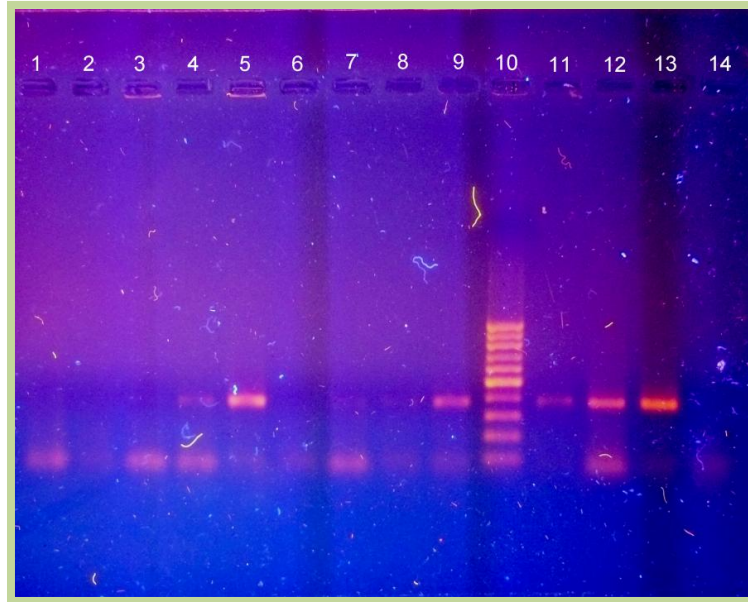


Figura 6: Perfil electroforético en gel de agarosa (1 % p/v) de los productos de amplificación con oligonucleótidos específicos para la especie *Lactobacillus*, del ADN extraído de las cepas: 1: *Saccaromyces cereviceae* CIDCA 812; 2: *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154; 3: *Lactobacillus brevis* JCM 1059; 4: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985; 5: *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348; 6: *Bifidobacterium* sp. CIDCA 5320; 7: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314; 8: *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332, 9: *Lactobacillus parakefir* DSMZ 10551; 10: Patrón de peso molecular de 1000 pb; 11: *Lactobacillus casei* DSMZ 20011; 12: *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174; 13: *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 ;14: *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865.

### 1.1.2.- Selección de las condiciones de amplificación

Dada la complejidad de las muestras y que no todos los oligonucleótidos poseen la misma afinidad por el ADN molde se buscaron las condiciones de amplificación que generen el mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos obtenidos mediante DGGE.

Las variables utilizadas fueron duplicar y triplicar tanto la cantidad de ADN molde como la cantidad de enzima polimerasa utilizada en la reacción de amplificación. Los amplicones resultantes fueron sembrados en un gel con gradiente desnaturizante químico.

Como resultado se encontró un mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos cuando se triplicó la cantidad de ADN molde para los 3 pares de oligonucleótidos usados.

Cuando se varió la cantidad de enzima polimerasa los resultados variaron de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos Lac1 y Lac2-GC, Bif164F y Bif662-GC generaron mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos cuando se duplicó la concentración de enzima polimerasa en la mezcla de reacción. Cuando se usaron los oligonucleótidos 518R y 341F-GC para la amplificación los mejores resultados se obtuvieron utilizando la concentración más baja de enzima estudiada.

### **1.1.3.- Selección de las condiciones de corrida para la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante químico.**

Se procedió a seleccionar los rangos de gradiente desnaturalizante a utilizar en los geles de poliacrilamida a fin de obtener una buena separación de los fragmentos de ADN amplificados.

Para ello se amplificó el ADN proveniente de contenido intestinal de ratón utilizando los tres pares de oligonucleótidos en las condiciones seleccionadas en el punto anterior y los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante de urea/formamida. Los gradientes ensayados fueron 30/60, 40/60, 45/65 y 45/70.

Como resultado se observó una buena separación de bandas para los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos 518R / 341R-GC y Lac1 / Lac2-GC cuando se utilizó un gradiente de urea formamida 40/60. En los perfiles electroforéticos de los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos Bif164F / Bif662-GC se observó una acumulación de bandas en la parte inferior en los geles con gradientes desnaturalizantes 30/60 y 40/60 y una buena distribución



de bandas a lo largo de todo el gel cuando se utilizó el gradiente desnaturalizante 45/65 (Figura 7) seleccionándose este gradiente para geles posteriores.

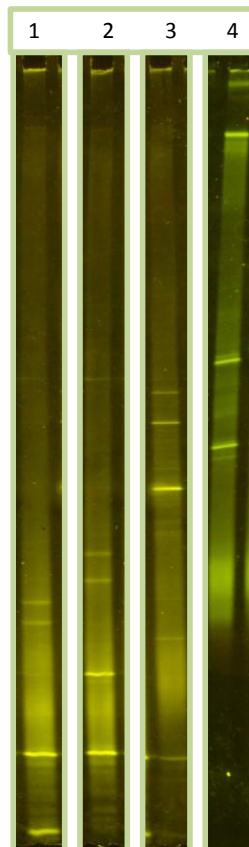


Figura 7: Perfiles electroforéticos con diferentes gradientes desnaturalizantes de los productos de amplificación de una muestra de ADN extraída de contenido intestinal de ratón con los oligonucleótidos Bif164F / Bif662-GC. Calle 1: Gradiente 30/60; Calle 2: Gradiente 40/60; Calle 3: Gradiente 45/65; Calle 4: Gradiente: 45/70.

### **1.2.- Análisis de la población de Eubacterias.**

Luego de poner a punto la metodología se analizó el contenido intestinal de los ratones a los que se les administró kefirán durante 2 y 7 días en el agua de bebida y de los ratones control.

Con este objetivo, el ADN obtenido de contenido intestinal de los ratones de los 3 grupos fue amplificado con oligonucleótidos para Eubacterias y separados por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante en las

condiciones seleccionadas previamente. En la Figura 8a se pueden observar los perfiles electroforéticos de la microbiota intestinal de los ratones de cada grupo. Analizando el grupo de ratones control podemos ver que existe una diversidad entre los perfiles obtenidos que también se observa en los ratones que consumieron kefiran. Este tipo de variaciones entre individuos ha sido ampliamente documentada utilizando esta metodología. Snart *et al.* (2006) al igual que Montesi *et al.* (2005) documentan la variabilidad de la microbiota intestinal entre ratones cuando analizan la microbiota de ratones alimentados con prebióticos. Los mismos resultados fueron descritos cuando se analiza la microbiota intestinal humana (Zoetendal *et al.*, 1998; Vanhoutte *et al.*, 2006).

Comparando los perfiles de los ratones que ingirieron kefiran durante 2 y 7 días con respecto a los ratones control se puede observar la aparición de bandas nuevas. Estos resultados indicarían un cambio en la microbiota intestinal inducido por el consumo de kefiran. La zona del gel donde aparecen mayoritariamente las nuevas bandas se encuentra remarcada en la Figura 8a. Se puede destacar que las nuevas bandas aparecen principalmente en la zona de mayor concentración de gradiente desnaturalizante, o sea que las fracciones de ADN contienen mayor contenido de GC en sus secuencias.

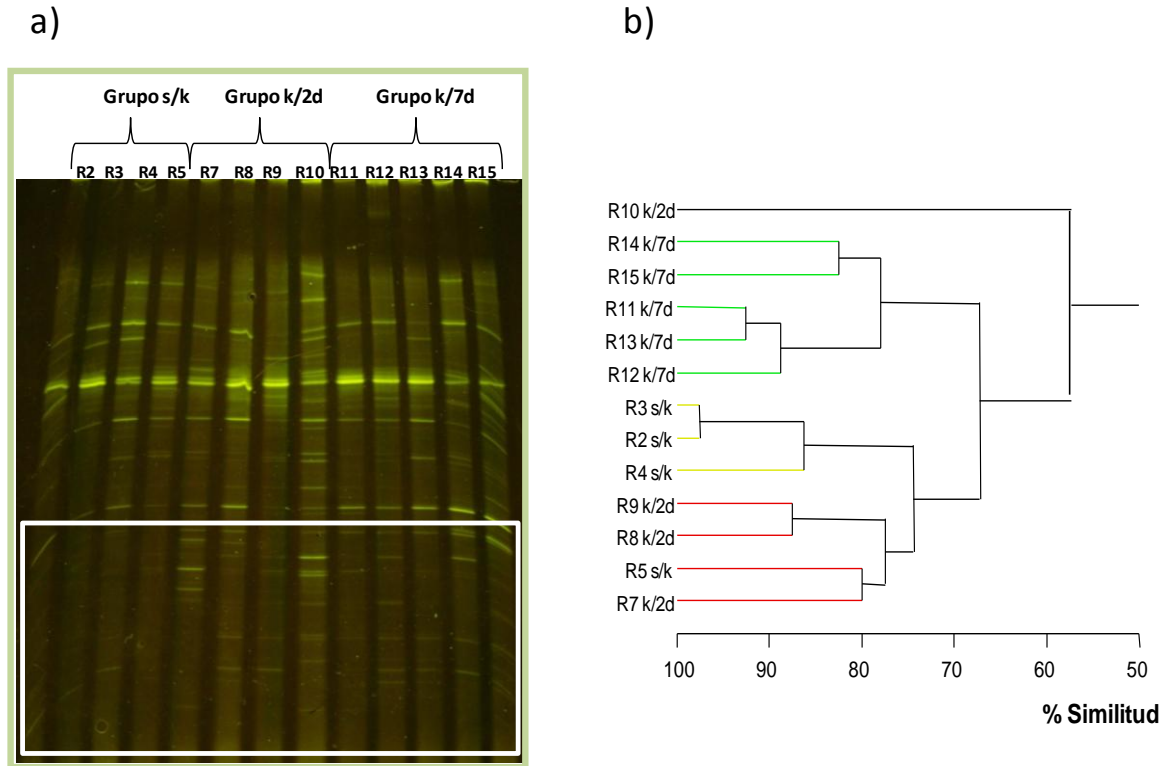


Figura 8: a) Perfil DGGE en gradientes 40-60% de productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratón utilizando oligonucleótidos universales para el gen que codifica el ARNr 16S en Eubacterias. **Grupo control (s/k)**: ratones que no consumieron kefirán; **Grupo k/2d**: ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 días; **Grupo k/7d**: ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 7 días. En el recuadro blanco se puede observar la zona donde aparece el mayor número de bandas. b) Análisis de cluster de los perfiles obtenidos en el gel a) utilizando el coeficiente de Jaccard y UPGMA.

La similitud existente entre los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los distintos grupos fue evaluada mediante el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) utilizando el programa Systat 12 (Figura 8b).

La mayoría de los perfiles agruparon con una similitud de 67% evidenciándose dos grupos. Uno de los grupos está constituido por los perfiles

representativos de la microbiota de ratones que recibieron una dieta suplementada con kefirán durante 7 días y el otro grupo está formado por los perfiles de la microbiota de los ratones de los grupos control y los que consumieron kefirán durante dos días. En este último cluster se puede observar la existencia de dos subgrupos con una homología entre ambos de 74 %. Uno que agrupo a los perfiles de los ratones control y otro que agrupa a los perfiles de los ratones que consumieron kefirán durante 2 días. Solo el ratón 10, que recibió una dieta suplementada con kefirán durante 2 días, presenta marcadas diferencias con respecto a los demás perfiles analizados; esto puede deberse a la variabilidad en la microbiota intestinal propia de cada ratón.

Cabe destacar que, a pesar de la variabilidad existente entre los individuos de un mismo grupo, la ingesta de kefirán produce un cambio en los perfiles electroforético sobre todo en los ratones que consumieron kefirán durante 7 días.

Con el objetivo de asignarle identidad a las bandas del gel que se muestra en la Figura 8a) se procedió a secuenciarlas

Con este fin se determinó inicialmente si cada banda provenía de un solo amplicón o bien era consecuencia de la co-migración de más de una banda. Para ello las bandas fueron cortadas del gel que se muestra en la Figura 8a), re-amplificadas (con los oligonucleótidos los 518R/341F-GC) y separadas nuevamente por electroforesis en gel con gradientes desnaturizante 40/50 o 50/60 dependiendo de la región del gel de donde provenían. Luego, las bandas fueron cortadas de estos geles, re-amplificados con los oligonucleótidos 518R/341R (sin GC) y enviados a secuenciar. Las secuencias encontradas fueron contrastadas con las presentes en el GenBank.

Como resultado se encontró que la mayoría de las secuencias no alineaban con ninguna especie descrita en el GenBank o bien alineaban con porciones del ARNr 16S de bacterias no cultivables.

Sin embargo se lograron identificar, con distintos porcentajes de similitud, las secuencias obtenidas de las bandas que se encuentran marcadas con letras en la Figura 9. En esta Figura cada letra señala a la banda que se encuentra por debajo de la misma. Además, cuando una letra se repite a una misma altura en el gel significa que las secuencias encontradas en el GenBank para esas bandas coinciden. Las bandas (señaladas con cada letra) y secuencias del Gen Bank con las cuales coinciden fueron las siguientes: a: *Dehalococcoides* sp., b: *Gardnerella vaginalis*, c: *Acidovorax radicus*/*Verminophrobacter* sp/*Acidovorax delafieldii*, d: *Bacteroides capillosus*, e: *Dehalogenimonas lykanthroporepellens*, f: *Clostridium difficile*, g: *Alistipes putredinis*, h: *Bacteroides* sp, i: *Listeria monocytogenes*, j: *Bifidobacterium* sp. De los microorganismos listados sólo algunos están descriptos para el hábitat de la microbiota intestinal. Sin embargo, el conocimiento que existe sobre los microorganismos que lo constituyen es aún escaso. Varios autores cuando estudiaron la composición de la microbiota fecal humana, mediante métodos independientes del cultivo, encontraron que un alto porcentaje de los microorganismos correspondían a bacterias no conocidas. Zoetendal *et al.* (1998) analizaron la microbiota fecal humana mediante DGGE encontraron que la mayoría de las bacterias no correspondían a bacterias conocidas, también demostraron la variación entre individuos de la microbiota intestinal. Suau *et al.* (1999) mostraron, mediante un análisis comparativo de clones de genes que codifican para el ARNr 16S, que el 76 % de los clones analizados (cultivables y no cultivables) corresponden a microorganismos desconocidos. Blaut *et al.* (2002) mostraron que la diversidad de la microbiota intestinal aumenta en adultos donde la mayoría de las unidades taxonómicas que estudiaron correspondieron a bacterias desconocidas.

Por otro lado se debe destacar que la banda “j” presente en los ratones R8 y R9, perteneciente al grupo que ingirió kefirán durante dos días, y R11 y

R12 pertenecientes al grupo que ingirió kefirán durante 7 días tienen una secuencia similar a las secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S de microorganismos del género *Bifidobacterium* (Figura 9). Esto resulta de gran interés porque éste género juega un rol importante y se lo asocia a mejoras en la salud y disminución en el riesgo de enfermedades en humanos (Robertfroid, 2010) y un aumento en el número de estos microorganismos en el tracto gastrointestinal (efecto bifidogénico) suele ser un marcador a seguir a la hora de analizar el efecto prebiótico de distintas sustancias.

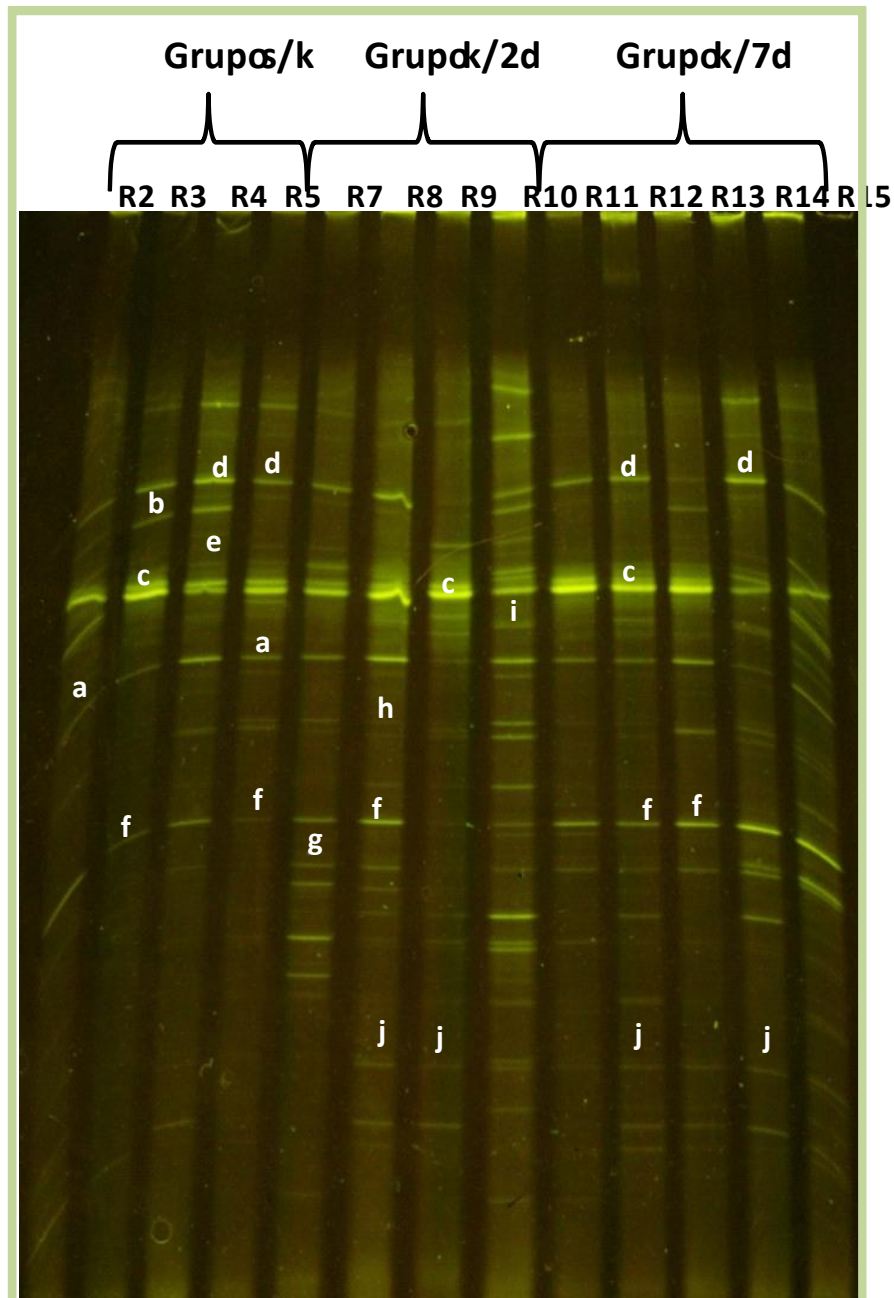


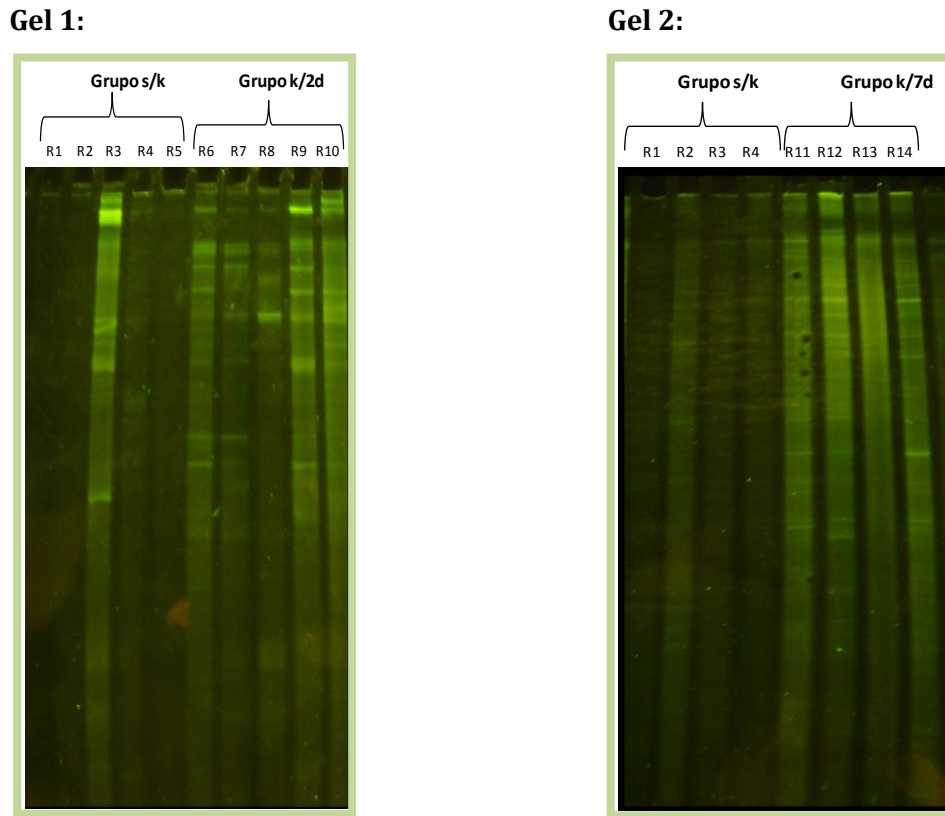
Figura 9: Perfil electroforético de los productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratones del grupo control s/k y ratones que ingirieron kefiran 2 y 7 días (grupo k/2d y grupo k/7d, respectivamente) en el agua de bebida utilizando oligonucleótidos para el gen que codifica el ARNr 16S en Eubacterias. Las bandas marcadas con letras (a hasta j) corresponden a aquellas cuyas secuencia coinciden con secuencias presentes en el GenBank. Cada letra señala a la banda que se encuentra debajo de la misma.

### **1.3.- Estudio de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos.**

Para analizar si existe una variabilidad específica de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* dentro de la microbiota intestinal se amplificó el ADN de todos los individuos con los oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC y LAC1 y LAC2-GC y se analizó mediante DGGE.

Los perfiles de bandas obtenidos con los oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC se muestran en la Figura 10. En los perfiles obtenidos a partir de los amplicones proveniente de los ratones del grupo control se observó un muy bajo número de bandas o ausencia de las mismas. Por otro lado, los perfiles de los amplicones provenientes de los ratones de los grupos que ingirieron kefirán durante 2 días y 7 días mostraron un mayor número de bandas. Esto indicaría un cambio en la microbiota intestinal de los ratones dentro del género *Bifidobacterium* inducido por la ingesta de kefirán.





**Figura 10:** Perfiles DGGE, en gradientes 45-65%, de productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratón utilizando oligonucleótidos específicos para el género *Bifidobacterium* (Bif164F y Bif662-GC). **Gel 1: Grupo control s/k:** ratones que no consumieron kefirán (R1, R2, R3, R4, R5); **Grupo k/2d:** ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 días (R6, R7, R8, R9, R10). **Gel 2: Grupo control s/k:** ratones que no consumieron kefirán (R1, R2, R3, R4); **Grupo k/7d:** ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 7 días (R11, R12, R13, R14).

La metodología utilizada para el análisis de la variabilidad específica del género *Lactobacillus* dentro de la microbiota intestinal de ratón fue la misma que la empleada en los casos anteriores, pero en este caso se utilizaron oligonucleótidos Lac1 y Lac2-GC como iniciadores en la reacción de amplificación. Como resultado se observaron perfiles electroforéticos muy similares para los individuos de los distintos grupos (Figura 11). Esto indicaría

que la adición de kefirán a la dieta de los ratones no provocó cambios en la población del género *Lactobacillus*.

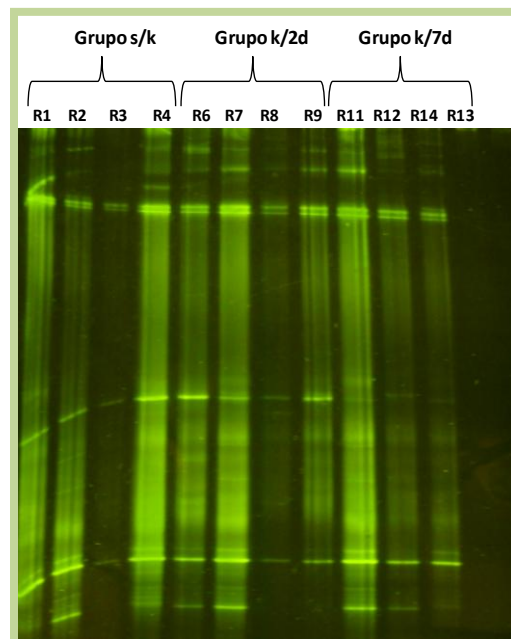


Figura 11: Perfiles DGGE, en gradientes 40-60%, de productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratón utilizando oligonucleótidos específicos para el género *Lactobacillus* (LAC1 y LAC2-GC). **Grupo control s/k**: ratones que no consumieron kefirán (R1, R2, R3, R4); **Grupo k/2d**: ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 días (R6, R7, R8, R9); **Grupo k/7d**: ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 7 días (R11, R12, R13, R14).

El análisis de los resultados obtenidos mediante PCR-DGGE y secuenciación del ADN extraído de la microbiota del contenido intestinal de ratones, evaluado con oligonucleótidos dirigidos a bacterias, permitió evidenciar un efecto en la microbiota intestinal de los ratones producido por la ingesta oral del kefirán. Esto se evidenció mediante el aumento en el número de bandas de los perfiles electroforéticos de amplicones obtenidos por amplificación del ADN de contenido intestinal de ratones que consumieron kefirán. Además mediante secuenciación se pudo confirmar que uno de los géneros que cambian dentro de la microbiota intestinal es *Bifidobacterium*, ya

que se vieron bandas que los representan sólo en los perfiles de ratones que consumieron kefirán. Estos resultados fueron confirmados al amplificar el ADN de las muestras con oligonucleótidos específicos para bifidobacterias ya que solo se detectaron bandas en los perfiles DGGE de los ratones que consumieron kefirán por 2 y 7 días. Por otro lado, la población de lactobacilos no fue modificada por la ingesta de kefirán en los tiempos ensayados.

Resultados similares encontraron Montesi *et al* (2005) cuando estudiaron los cambios producidos sobre la microbiota de ratones que ingirieron fructooligosacáridos comparado con un grupo control utilizando PCR específicas para especie con los mismos oligonucleótidos iniciadores que los utilizados en este trabajo de tesis.

## **2.- Efecto de la administración oral de kefirán sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones.**

Con el objetivo de analizar los posibles cambios inducidos por la ingesta de polisacárido en la microbiota fecal se realizaron ensayos en los cuales ratones de la línea Balb C fueron individualizados dentro de cada grupo dietario y se siguió como marcador la evolución de la microbiota fecal durante el periodo de ingesta del polisacárido.

Los ratones fueron divididos grupos:

**Grupo control:** (ratones 1 a 6) recibieron una dieta balanceada durante 21 días.

**Grupo k/21d:** (ratones 7 a 12) recibieron una dieta balanceada y se incorporó kefirán en el agua de bebida en una concentración de 300 mg/l.

## 2.1.- Evolución de poblaciones bacterianas en muestras de materia fecal

El análisis del efecto de la administración oral del kefirán sobre la evolución de la microbiota fecal se realizó mediante PCR-DGGE. Las poblaciones microbianas que se estudiaron fueron, al igual que en el experimento anterior, Eubacterias, bifidobacterias y lactobacilos utilizándose los mismos oligonucleótidos sintéticos que en el punto anterior.

### 2.1.1.- Análisis de la evolución de la población de Eubacterias.

El ADN extraído de materia fecal de cada ratón en los días 0, 2, 7, 14 y 21 fue amplificado utilizando oligonucleótidos para Eubacterias y los amplicones obtenidos fueron separados por DGGE. En la Figura 12 se muestra, a modo de ejemplo, los perfiles obtenidos en las muestras obtenidas a partir del ratón 1 del grupo control los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento. Los perfiles obtenidos en las muestras de materia fecal durante el ensayo son similares, observándose algunas pocas diferencias en el número e intensidad de las bandas presentes.

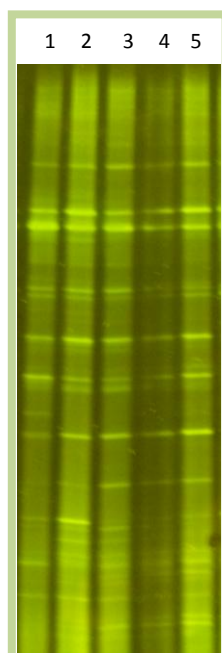


Figura 12: Perfil DGGE, en gradientes desnaturalizantes 40-60%, de productos de la amplificación de ADN de materia fecal del ratón 1, perteneciente al grupo control, utilizando los oligonucleótidos 518R y 341F-GC. Calles: 1: ratón 1, día 0; 2: ratón 1, día 2; 3: ratón 1 día 7; 4: ratón 1 día 14; 5: ratón 1 día 21.

El ADN extraído de muestras de materia fecal de los ratones del grupo que consumió kefiran en el agua de bebida (ratones 7, 8, 9, 10, 11 y 12) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento fueron amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para Eubacterias y los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados por DGGE. Los perfiles electroforéticos se muestran en la Figura 13.

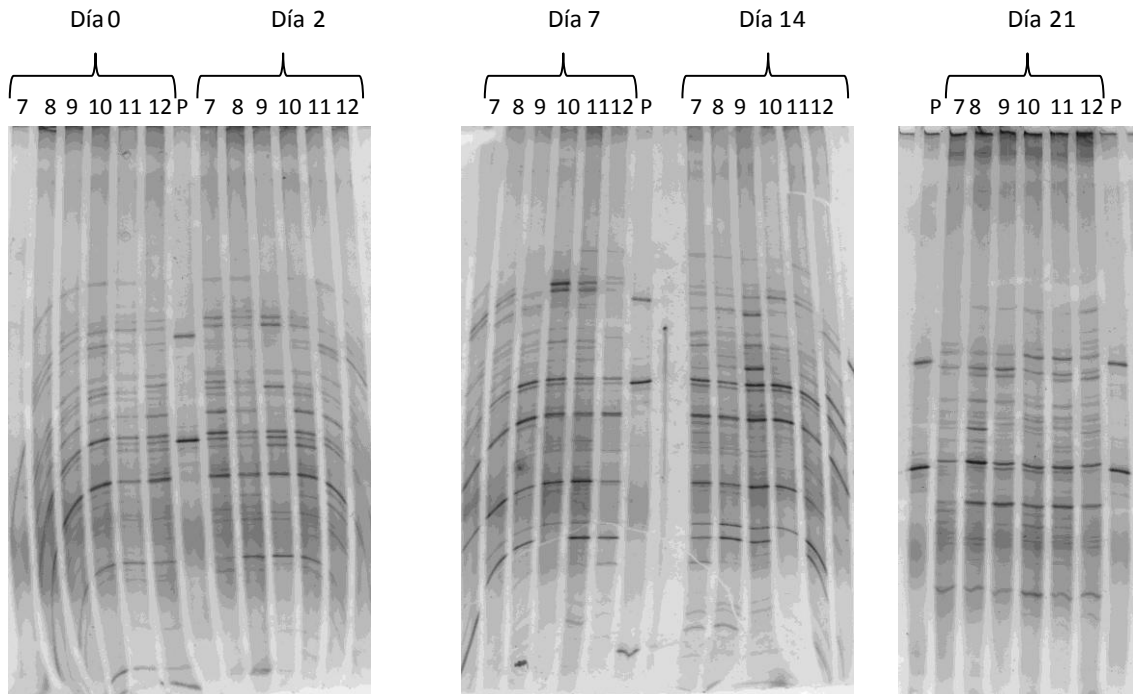


Figura 13: Perfiles DGGE, en gradiente desnaturalizante 40-60%, de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal de los ratones del grupo k/21d (ratones 7, 8, 9, 10, 11 y 12) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos 518R y 341F-GC. P: patrón formado por productos de amplificación de ADN de *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb plantarum* DSMZ 20174 y *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6984 con los oligonucleótidos 518R y 341F-GC.

En la misma se pueden comparar los perfiles obtenidos para distintos ratones al comienzo del ensayo indicando que los perfiles no son exactamente iguales y se puede seguir la evolución de la microbiota de cada ratón durante el tiempo de consumo de kefiran. Los datos se analizaron utilizando el programa Systat 12 (Figura 14). La similitud existente entre los perfiles electroforéticos

fue evaluada mediante el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA).

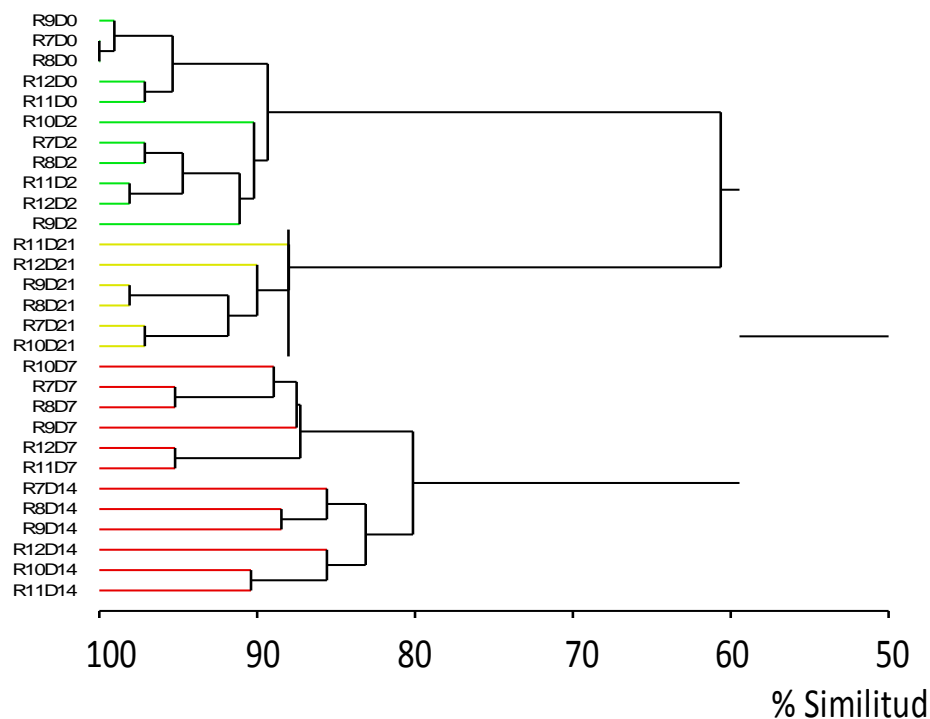


Figura 14: Dendrograma obtenido por análisis estadístico de los perfiles DGGE mostrados en la Figura 13 de los productos de amplificación del ADN extraído de las muestras tomadas de los ratones que ingirieron kefirán a los 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento (ratones 7, 8, 9, 10, 11 y 12)

El análisis de cluster muestra un 59 % de similitud entre los perfiles de la microbiota fecal de los ratones que consumieron kefirán en el agua de bebida durante el ensayo. Se puede observar la formación de 3 clusters bien definidos. El cluster 1 está formado por las muestras tomadas los días 0 y 2 de ensayo que se agrupan de manera independiente con un alto porcentaje de similitud entre

las mismas (89, 3 %), el cluster 2 está formado por las muestras tomadas a los ratones el día 21 del ensayo y el cluster 3 está integrado por las muestras tomadas el día 7 y el día 14 del tratamiento agrupadas con un 80 % de similitud. Se puede destacar que las muestras agrupan según el tiempo de ingesta de kefirán (día en que fue tomada la muestra) indicando qué, a pesar de la variabilidad propia de la microbiota de cada ratón, este polisacárido estaría induciendo cambios que se evidencian en los perfiles DGGE.

### **2.1.2.- Evolución en los perfiles de bifidobacterias y lactobacilos**

El ADN extraído de la materia fecal de los ratones que ingirieron kefirán y los ratones utilizados como control se amplificó también con los oligonucleótidos específicos para los grupos bifidobacterias y lactobacilos.

En la Figura 15 a y b se muestran, a modo de ejemplo, los perfiles DGGE obtenidos a partir de la amplificación con oligonucleótidos específicos para el grupo *Bifidobacterium* del ADN extraído de la materia fecal de los ratones 7 y 9 que consumieron kefirán a los días 0, 2, 7, 14 y 21 del ensayo. En la Figura 15 a) se ve claramente un aumento tanto en el número como en la intensidad de las bandas al día 7 del ensayo para el ratón 7. Se puede destacar que las nuevas bandas observadas en el perfil desde el día 7 mantuvieron su intensidad hasta el día 21 del ensayo, lo que indicaría un aumento en la población de bifidobacterias que se mantiene durante el tiempo del ensayo. La Figura 15 b) muestra el perfil DGGE del ratón 9 observándose un aumento del número de bandas desde el día 14 del tratamiento. En el ratón 9 se observa un menor número de bandas que en el ratón 7 y además una de las bandas presente en el día 14 disminuye en intensidad en el día 21 (banda marcada con un círculo en la Figura 15 b). Estas dos tendencias se observaron en todos los ratones de este grupo. Por lo tanto podemos inferir que hay un cambio en la población de bifidobacterias en la microbiota de los ratones que ingirieron kefirán.

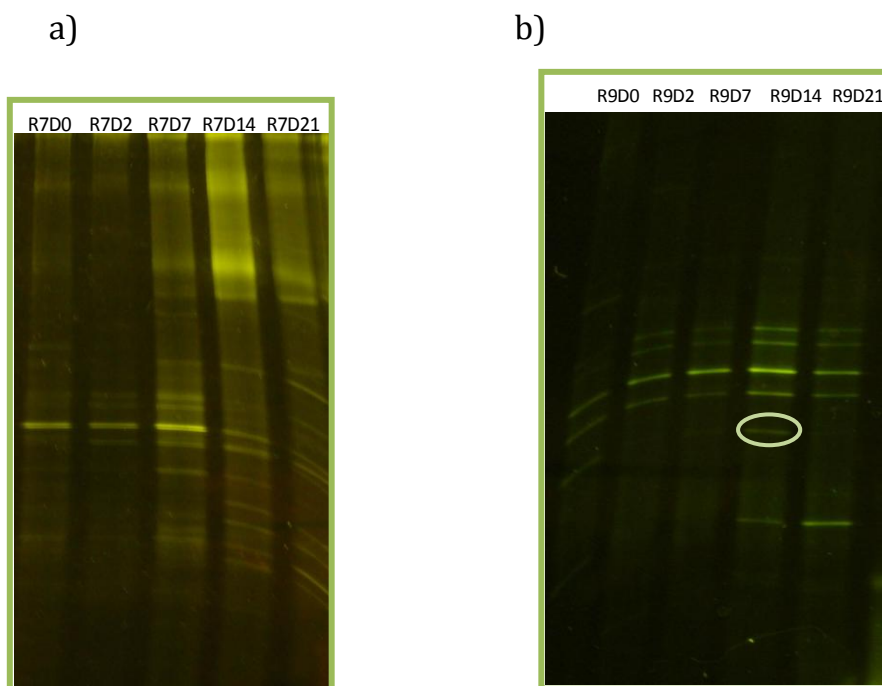


Figura 15: a) Perfil DGGE de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal del ratón 7 (grupo k/21d) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. b) Perfil DGGE de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal del ratón 9 (grupo k/21d) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos específicos para el género *Bifidobacterium* (Bif164F y Bif662-GC) y el gradiente desnaturalizante fue 45-65%.

El género *Lactobacillus* fue analizado por esta técnica utilizando el ADN extraído de la materia fecal de los ratones de los distintos grupos y amplificado con los oligonucleótidos específicos para el grupo *Lactobacillus*. Los perfiles electroforéticos mostraron un muy bajo número de bandas en todas las muestras analizadas y no se observaron cambios en la posición de las bandas, coincidiendo con los resultados del ensayo anterior.

Teniendo en cuenta los resultados presentados se puede concluir que la ingesta de kefir produce una modificación en la microbiota fecal de ratones específicamente en la población de bifidobacterias, no observándose cambios en la población de lactobacilos.



## **2.2.- Cuantificación de poblaciones bacterianas mediante hibridación *in situ* fluorescente y citometría de flujo.**

Para cuantificar los cambios en las poblaciones microbianas se evaluó la materia fecal de los ratones pertenecientes a ambos grupos mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes y citometría de flujo. Se utilizaron sondas específicas para Eubacterias (Eub 338) y Non eubacterias (NONEub), marcadas con FITC, bifidobacterias (Bif 164) marcadas con Alexa FLuor 532 y lactobacilos (Lab 158) marcadas con Alexafluor 647. Los fluorocromos FITC y Alexafluor 647 emiten fluorescencia verde y Alexa FLuor 532, fluorescencia roja.

### **2.2.1.- Puesta a punto del método. Especificidad de las sondas.**

Para analizar la especificidad de las sondas y constatar una hibridación efectiva se tomaron cultivos puros de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8324 y *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, se marcaron con las sondas Eub 338-FITC, NonEUB-FITC, Bif 164-Alexa FLuor 532 y Lab 158-Alexafluor 647 y se observaron en un microscopio laser confocal. En la Figura 16 a y b, se observan las microfotografías de un cultivo de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8324 marcado con sondas específicas para Eubacteria y lactobacilos, respectivamente. En la Figura 16 c y d se muestra la microfotografía de un cultivo de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, marcado con sondas específicas para bifidobacterias y Eubacterias, respectivamente. Se puede observar que cada sonda hibrida con los microorganismos para los cuales son específicas demostrando que el tratamiento realizado a la muestra para permeabilizar e hibridar las bacterias es efectivo. Además, las muestras de *Lb plantarum* CIDCA 8324 sin marcar y marcadas con sondas para bifidobacterias y NON-Eubacteria no mostraron fluorescencia en ninguno de los casos. El mismo resultado se encontró cuando

muestras de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865 sin marcar y marcadas con sondas específicas para lactobacilos y NON-Eubacterias fueron evaluadas. Indicando la especificidad de las sondas utilizadas.

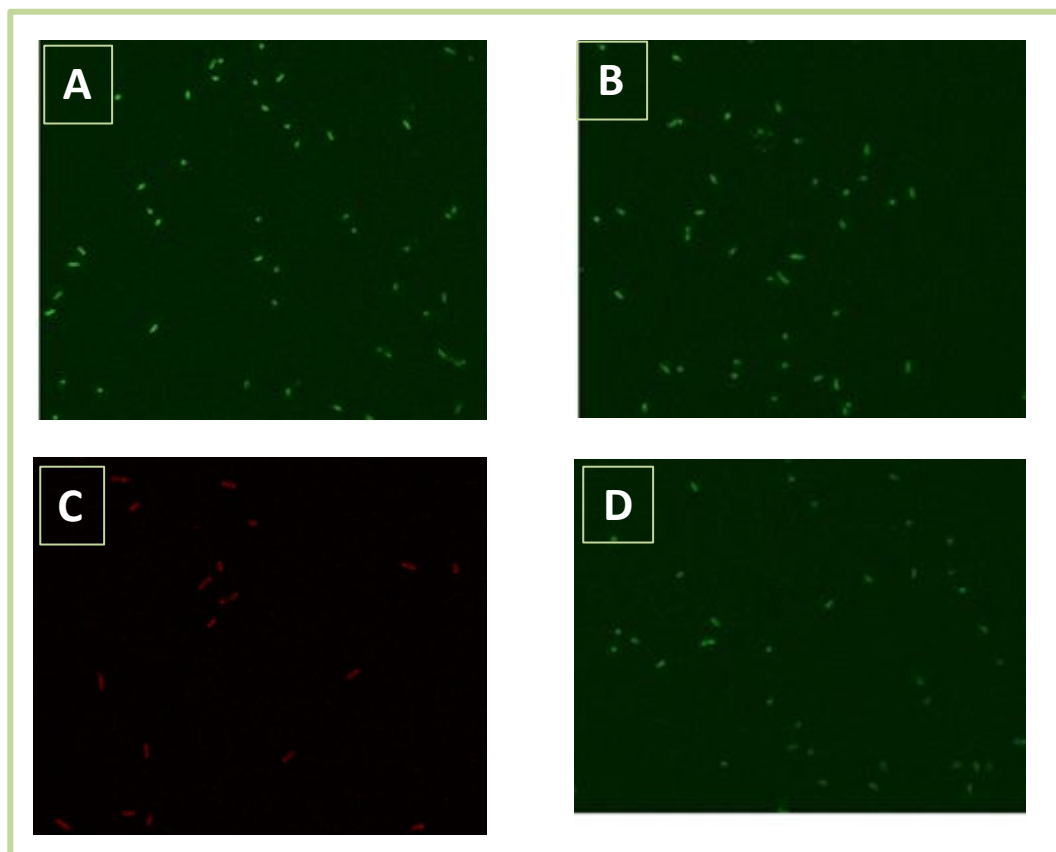


Figura 16: a y b: Microfotografías de un muestra de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8324 marcada con sondas específicas para Eubacteria y lactobacilos, respectivamente. c y d: Microfotografía de una muestra de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, marcada con sondas específicas para bifidobacteria y Eubacteria, respectivamente. Ambas microfotografías fueron tomadas en un microscopio laser confocal.

### 2.2.2.- Cuantificación de poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias mediante Hibridación *in situ* fluorescente y citometría de flujo.

Para determinar la cantidad de lactobacilos y bifidobacterias presentes en la materia fecal de los ratones de los grupos que ingirieron kefiran y control

se procedió a marcar las muestras con las sondas fluorescentes anteriormente mencionadas y se realizó la adquisición de eventos en un citómetro de flujo.

La hibridación fue constatada por observación de las muestras en microscopio laser confocal, obteniéndose los mismos resultados que en el caso de las muestras puras, confirmándose la efectividad de la hibridación. En las Figuras 17 a y b se presentan, a modo de ejemplo, una fotografía de una muestra de materia fecal (ratón 1, día 0 de tratamiento) marcada con sonda fluorescente específica para Eubacterias y observada con y sin fluorescencia, respectivamente.

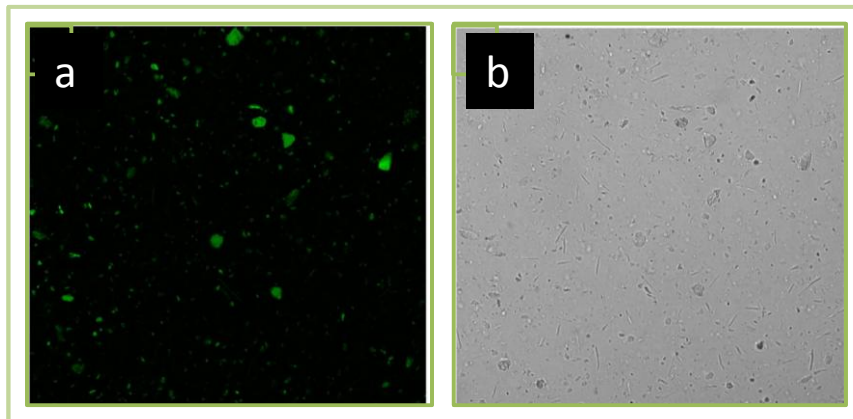


Figura 17 a y b: Microfotografías de un muestra de materia fecal marcada con sonda específica para Eubacteria observadas con y sin fluorescencia, respectivamente.

En la fotografía se pueden observar diferentes estructuras que florecen de manera tal que se observan de color verde. La citometría de flujo permite diferenciar estas partículas por su tamaño y complejidad, por lo tanto este pegado inespecífico de las sondas no generaría errores en la determinación de las poblaciones bacterianas.

Dado que en las muestras se encuentran partículas no bacterianas se seleccionó la zona de trabajo donde se encuentra a esta población. Para ello se marcó una muestra de materia fecal con la sonda fluorescente Eub 338-FITC, se

analizó con el citómetro y se delimitó, en el gráfico de el *side scatter* (SSC) en función de *forward scatter* (FSC), la región donde se encuentran partículas del tamaño y forma adecuadas.

La metodología utilizada para el análisis de resultados se resume en la Figura 18. La Figura 18a muestra a modo de ejemplo un gráfico de puntos que representa la adquisición de eventos en una muestra de materia fecal marcada con la sonda Eub 338-FITC específica para Eubacterias. En este gráfico se representa el *side scatter* (SSC) en el eje “y” en función de *forward scatter* (FSC) en el eje “x”. La región R2 que está delimitada en este gráfico muestra los eventos correspondientes a Eubacterias de los eventos totales de la muestra. Esta zona se delimitó teniendo en cuenta los resultados de la Figura 18b). La figura 18b representa la fluorescencia roja (FL4) en función de la fluorescencia verde esperada para Eubacterias (FL1). Allí se observa la región marcada como R1 que representa la población de bacterias con fluorescencia verde, o sea es representativa de la población de Eubacterias. Con los eventos adquiridos en la región R2 se realizó el gráfico fluorescencia roja (FL4) en función de la fluorescencia verde esperada para Eubacterias (FL1) y se delimitó la región R3 (Figura 18c) para hacer el histograma representado en la Figura 18d) La porción del histograma que está marcada como M1 corresponde al porcentaje de bacterias marcadas.

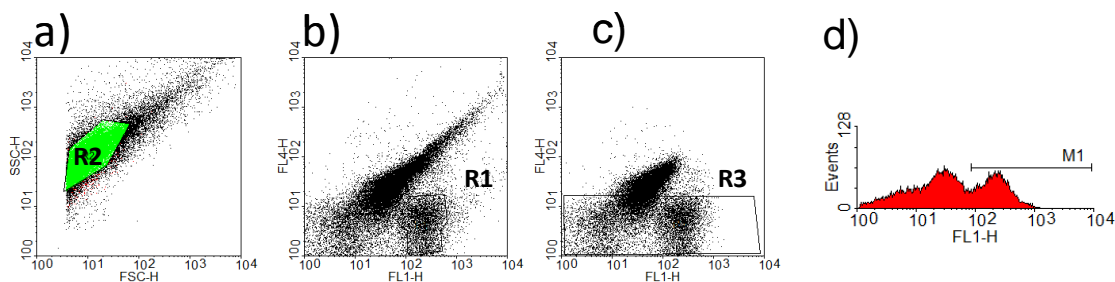


Figura 18: Ejemplo del análisis de datos para el estudio de poblaciones de Eubacterias en materia fecal marcada con la sonda fluorescente Eub 338-FITC por citometría de flujo.

Este mismo análisis se realizó cuando las muestras fueron marcadas con sondas para bifidobacterias y lactobacilos.

Como resultado de la cuantificación de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos se encontró que en la materia fecal el porcentaje inicial (día 0) de la población de bifidobacterias varió entre 6 y 14 % y la población de lactobacilos entre 30 y 45 %.

La Figura 19 muestra, a modo de ejemplo, el porcentaje de bifidobacterias presente en la materia fecal de un ratón del grupo control (R5) entre los días 0 y 21 del ensayo. Como se puede observar la población de bifidobacterias aumenta de 11 a 17 % entre los días 0 y 14 del ensayo y disminuye hasta su valor inicial el día 21 (11%). El mismo comportamiento, con distintos porcentajes, se observó para los demás ratones de éste grupo.

En la misma Figura (Figura 19) se muestran los porcentajes de bifidobacterias presente en la materia fecal de ratones que ingirieron kefiran (R7, R9 y R11) entre los días 0 y 21 del ensayo. En este grupo de ratones no se observó una tendencia única de aumento o disminución a lo largo del tiempo. El ratón 7 mostró una disminución en el porcentaje de bifidobacterias el día 2 del ensayo y aumento los días 7, 14 y 21. El porcentaje de bifidobacterias en este ratón fue de 14 % el día 0 y de 28 % el día 21. El ratón 9 mostró una disminución del porcentaje de bifidobacterias el día 7 del ensayo y aumento los

días 2, 14 y 21. El porcentaje de bifidobacterias en este ratón fue de 8 % el día 0 y de 26 % el día 21. El ratón 11 mostró una disminución del porcentaje de bifidobacterias los días 2 y 7 y aumento los días 14 y 21. El porcentaje de bifidobacterias en este ratón fue de 9 % el día 0 y de 23 % el día 21

De estos resultados se puede destacar que los ratones del grupo control no mostraron variaciones en los porcentajes de bifidobacterias entre el inicio y el final del ensayo mientras que los ratones pertenecientes al grupo que ingirió kefiran duplican o triplican la cantidad de bifidobacterias en materia fecal entre el día 0 y 21.

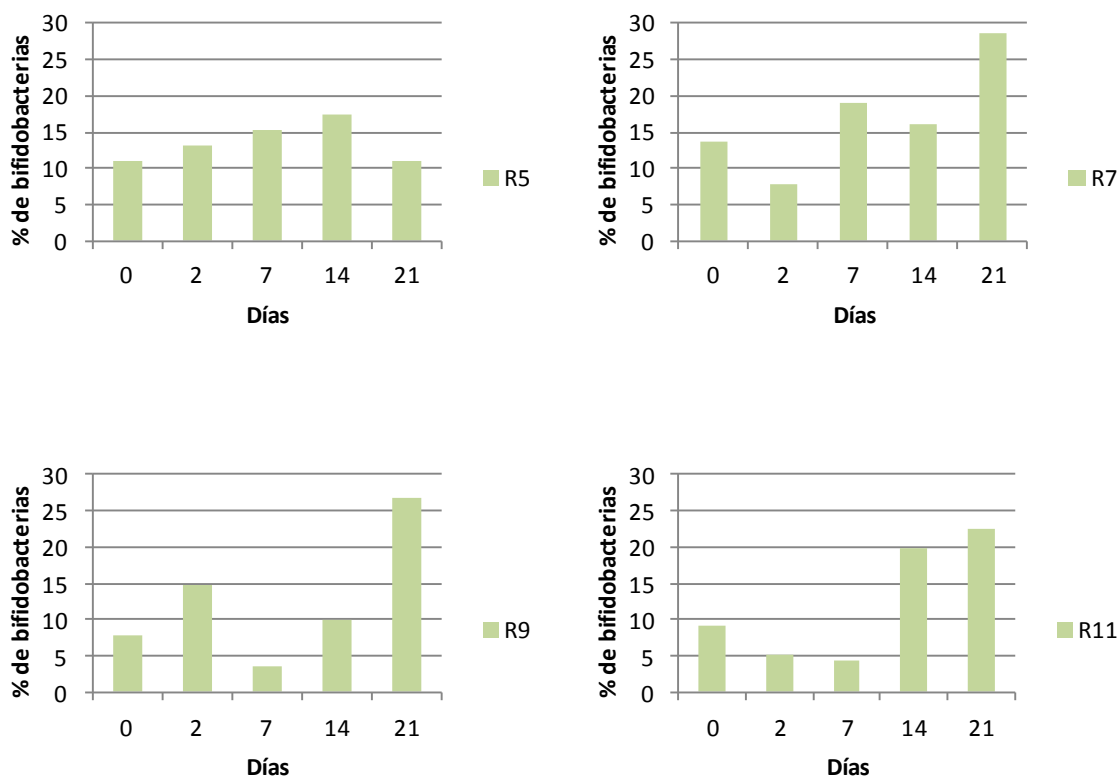


Figura 19: Porcentaje de bifidobacterias presentes en la materia fecal del ratón R5, grupo control y de los ratones R7, R9 y R11, grupo que ingirió kefiran.

La Figura 20 muestra, a modo de ejemplo, los porcentajes de lactobacilos presente en la materia fecal de un ratón del grupo control (R5) entre los días 0 y 21 del ensayo. Como se puede observar la población de lactobacilos se mantiene constante entre los días 0 y 7 (aproximadamente 39 %), disminuye el día 14 (26%) y disminuye, en relación al día 0, el día 21 (34 %). En la misma Figura se muestran los porcentajes de lactobacilos presente en la materia fecal de ratones que ingirieron kefiran (R7, R9 y R11) entre los días 0 y 21 del ensayo. Como se puede observar para este grupo de ratones el porcentaje de lactobacilos tiende a disminuir entre el día 0 y 21. Para el ratón 7 el porcentaje de lactobacilos varió entre 48 y 20 %; para el ratón 9 entre 38 y 28 % y para el ratón 11 entre 30 y 21%, entre los días 0 y 21 del ensayo.

Estos resultados muestran que, tanto en los ratones del grupo control como en los ratones que ingirieron kefiran, el porcentaje de lactobacilos en materia fecal disminuye entre el inicio y el final del ensayo.

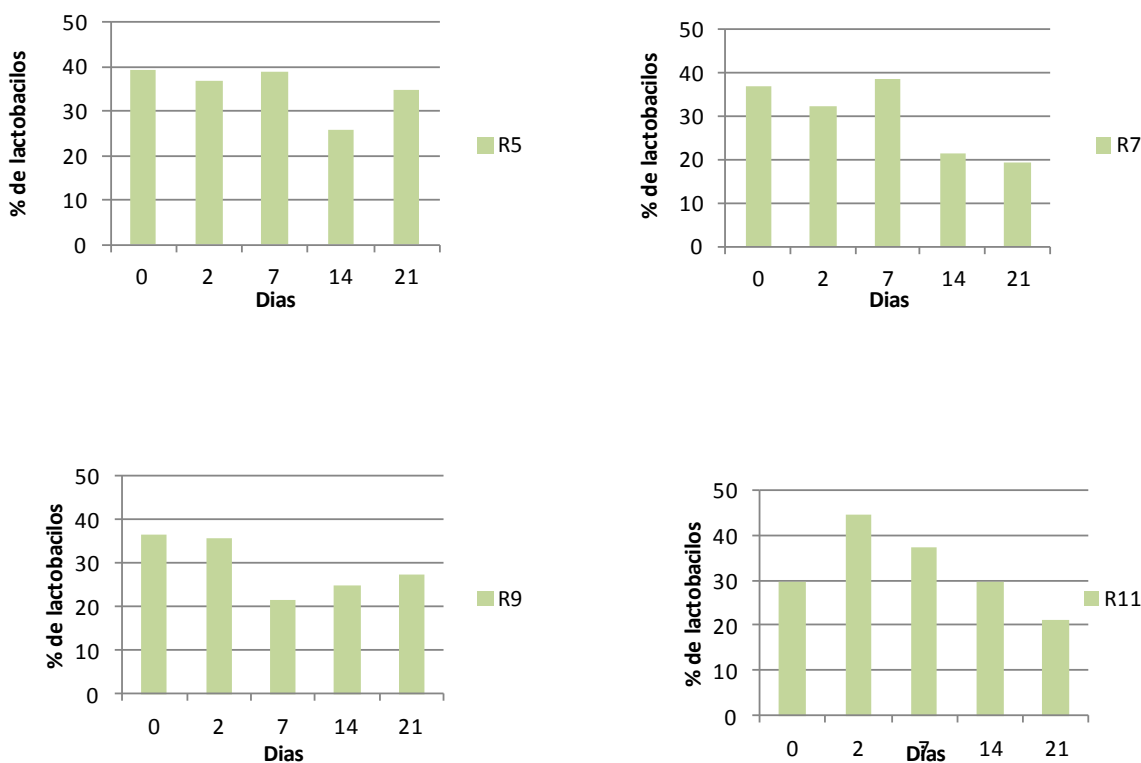


Figura 20: Porcentaje de lactobacilos presentes en la materia fecal del ratón R5, grupo control y de los ratones R7, R9 y R11, grupo que ingirió kefiran.

Si comparamos los resultados obtenidos por PCR-DGGE y FISH-citometría para este ensayo podemos concluir que las tendencias observadas por la primer metodología descrita es confirmada mediante la cuantificación por FISH- citometría. Cuando se analizaron las poblaciones de bifidobacterias en materia fecal por PCR-DGGE se observó un aumento de número de bandas con el tiempo del ensayo para los ratones que consumieron kefiran hecho que se confirmó mediante FISH-citometría. Asimismo cuando se estudiaron las poblaciones de lactobacilos mediante PCR-DGGE en materia fecal de ratones que consumieron kefiran no se observaron nuevas bandas y los resultados de la cuantificación mediante FISH-citometría mostraron una tendencia a disminuir de ésta población.



### **3.-Efecto de la administración oral del polisacárido producido por *Lb paracasei* CIDCA 83124 sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones**

El efecto de la administración oral del polisacárido de *Lb paracasei* CIDCA 83124 sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones se llevo a cabo utilizando el mismo diseño experimental que para el estudio del efecto de la ingesta de kefiran. Para ello los ratones se dividieron en los siguientes grupos:

**Grupo control:** (ratones 1 a 6) recibieron una dieta balanceada durante 21 días;

**Grupo 83124/21d:** (ratones 13 a 18) recibieron una dieta balanceada y se incorporó el polisacárido producido por la cepa CIDCA 83124 en el agua de bebida en una concentración de 300 mg/l.

#### **3.1.- Evolución de poblaciones bacterianas en muestras de materia fecal.**

El análisis del efecto de la administración oral del polisacárido del microorganismo CIDCA 83124 sobre la evolución de la microbiota fecal se realizó mediante PCR-DGGE. Las poblaciones celulares que se estudiaron fueron bifidobacterias y lactobacilos.

##### **3.1.1.- Evolución en los perfiles de bifidobacterias y lactobacilos**

La Figura 21 muestra, a modo de ejemplo, el perfil electroforético obtenido a partir de la amplificación con oligonucleótidos específicos para el grupo *Bifidobacterium* del ADN extraído de la materia fecal del ratón 14 perteneciente al grupo que ingirió el polisacárido del microorganismo *Lb paracasei* CIDCA 83124 los días 0, 2 , 7, 14 y 21 de tratamiento. Como se puede

observar no hay una cambio detectable por esta técnica en la población de bifidobacterias de la materia fecal de los ratones alimentados con este EPS. Este mismo resultado se observó para todos los ratones de este grupo.

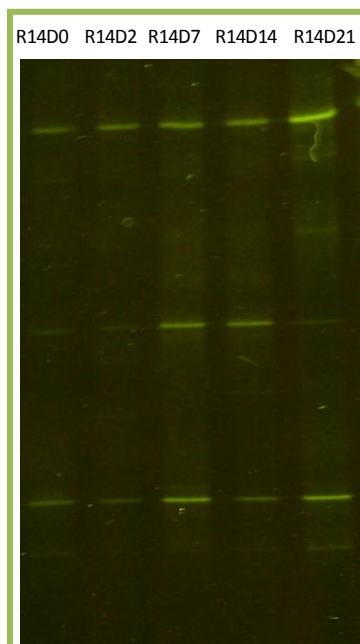


Figura 21: Perfil DGGE de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal del ratón 14 (grupo 83124/21d) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos específicos para el género *Bifidobacterium* (Bif164F y Bif662-GC) y el gradiente desnaturizante fue 45-65%.

En los perfiles obtenidos por amplificación del ADN de la materia fecal de los ratones a los cuales se les administró el polisacárido producido por *Lb paracasei* CIDCA 83124 con oligonucleótidos específicos para lactobacilos se observó bajo número de bandas, no detectándose cambios en los perfiles.

Estos resultados permiten inferir que este polisacárido no es capaz de inducir cambios en las poblaciones específicas de bifidobacterias y lactobacilos en la microbiota de los ratones que lo ingirieron, mostrando una marcada diferencia con los resultados obtenidos para la microbiota de los ratones que ingirieron kefiran. Este polisacárido presenta un peso molecular similar al del kefiran pero está constituido por diferentes monosacáridos ya que posee en su

composición aminoazúcares. Es factible que esta diferencia estructural sea la responsable del diferente comportamiento encontrado en los ensayos *in vivo*.

### **3.2.- Comparación del efecto del consumo de kefirán y del consumo del polisacárido producido por el *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124**

Se estudiaron el efecto en el peso de los ratones y el efecto en la cantidad de lactobacilos y bifidobacterias viables, mediante recuento en placa, en los ratones del grupo control y los ratones que ingirieron kefirán o el polisacárido producido por *Lb paracasei* CIDCA 83124 en el agua de bebida.

#### **3.2.1.-Peso de los ratones.**

Para analizar el efecto de la dieta sobre el peso de los ratones se calcularon las diferencias entre el peso inicial ( $P_i$ ) y final ( $P_f$ ) para cada ratón y luego se promediaron los valores obtenidos para los ratones pertenecientes a cada grupo. Los resultados muestran un aumento de peso promedio para el grupo control de 1,07 kg, para el grupo que ingirió kefirán de 1,04 kg y para el grupo que ingirió el polisacárido de *Lb paracasei* CIDCA 83124 de 1,08 kg, siendo estas diferencias no significativas con un 95% de confianza (Figura 22). Por lo tanto podemos decir que la ingesta de ambos polisacáridos en el agua de bebida no provoca cambios significativos en el peso de los ratones no encontrándose una relación con la modificación de las poblaciones de bifidobacterias que se asoció a la ingesta de kefirán

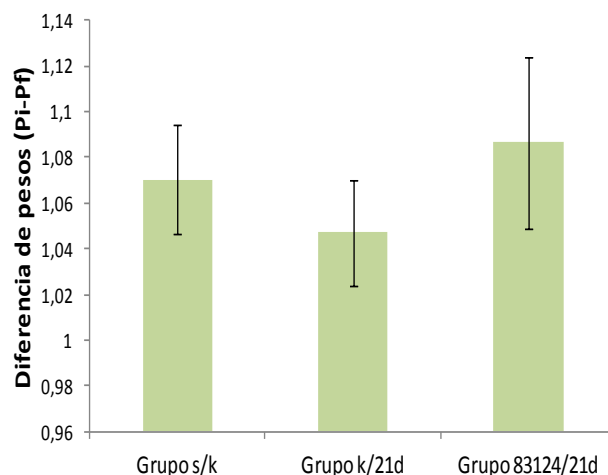


Figura 22: Aumento de peso de los ratones. Valor promedio de las diferencias de peso inicial menos final (Pi-Pf) de los ratones pertenecientes a cada grupo dietario. Grupo s/k: grupo control. Grupo k/21d: grupo suplementado con kefiran (300 mg/L) *ad libitum* en el agua de bebida durante 21 días. Grupo 83124/21d: grupo suplementado con EPS aislado de la cepa *Lb paracasei* CIDCA 83124 (300 mg/L) *ad libitum* en el agua de bebida durante 21 días

### 3.2.2.- Recuento de microorganismos viables.

Se realizó un recuento total de bifidobacterias y lactobacilos en la materia fecal de cada ratón los días 0 y 21 del ensayo. Los resultados de los recuentos (ufc/ml) se presentan en la Figura 23.

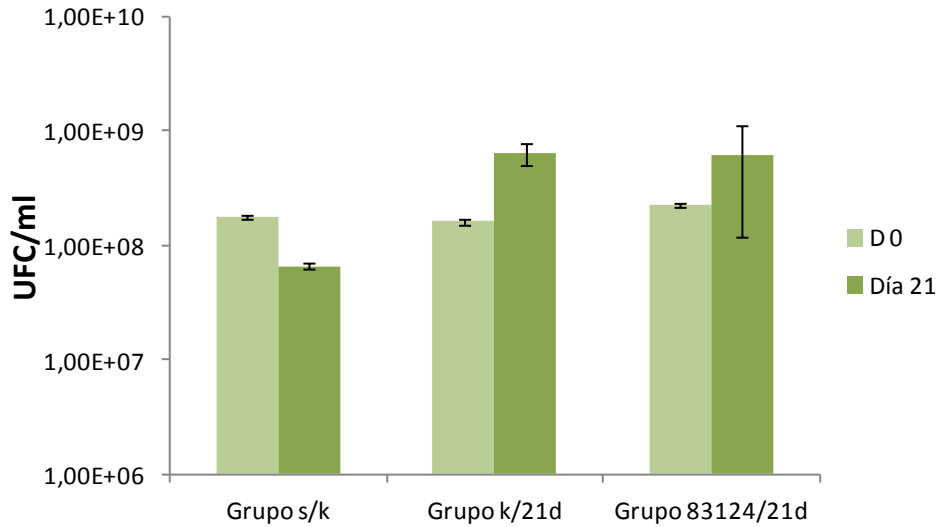


Figura 23: Recuento de lactobacilos y bifidobacterias de materia fecal de animales del grupo s/k, 83124/21d y k/21d en los días 0 y 21 del tratamiento. Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes con  $p \leq 0,05$ .

Como resultado se observó en la materia fecal de los ratones del grupo control una disminución en la cantidad de lactobacilos y bifidobacterias entre el inicio y el final del ensayo; en la materia fecal de los ratones del grupo que ingirió el polisacárido de la cepa CIDCA 83124 no se revelaron diferencias en dichas poblaciones. Finalmente, los ratones que ingirieron kefiran mostraron un aumento significativo del número de lactobacilos y bifidobacterias viables en su materia fecal, entre el inicio y el final del ensayo.

A pesar de que mediante esta metodología no se pueden diferenciar las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos, las tendencias encontradas se pueden comparar con los resultados encontrados mediante la cuantificación de bifidobacterias por FISH-citometría y PCR-DGGE para los ratones de los grupos control y los ratones que ingirieron kefiran durante 21 días. Se puede destacar que el aumento que se evidenció en la población de microorganismos viables detectado para el grupo que ingirió kefiran podría estar relacionado al aumento de la población de bifidobacterias de este grupo de ratones.

En cuanto al polisacárido producido por el *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 no demostró ser efectivo en la modificación de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos confirmando que el polisacárido producido por este microorganismo es diferente al kefirán y demostrando que el efecto modulador de la microbiota es específico para cada molécula.

De acuerdo a los resultados presentados y para considerar al kefirán como prebiótico, éste debe cumplir con una serie de requisitos.

En relación a esto podemos decir que el kefirán es un compuesto correctamente identificado en cuanto a su nombre químico, características físico-química, descripción, fuente y origen, pureza y contaminantes. Además es resistente a la acidez gástrica y no se han documentado riesgos para la salud provocadas por este polisacárido. Los efectos fisiológicos documentados para el kefirán en modelos murinos incluyen actividad inmunomoduladora, anticolesterolémica, antitumoral, antagonista de factores de virulencia de *Bacillus cereus* y antimicrobiano (ítem 2.4.2.- Funcionalidad biológica del kefirán de Introducción General). Por otro lado, los resultados documentados en este capítulo muestran que el kefirán tiene la capacidad de aumentar selectivamente la población potencialmente benéfica de bifidobacterias en la materia fecal de los ratones utilizados. Por lo tanto el kefirán se podría considerar una sustancia potencialmente prebiótica contribuyendo a las propiedades promotoras de la salud que se le atribuyen al kefir.

## Conclusiones

- La evaluación de la microbiota fecal de ratones mediante DGGE utilizando oligonucleótidos universales 518R/341F-GC permitió obtener perfiles electroforéticos con un alto número de bandas.
- Triplicar la concentración de ADN molde en la reacción de amplificación con los oligonucleótidos 518R/341F-GC, Lac1/Lac2-GC y Bif164F/Bif662-GC generó amplicones que producen mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos.
- Duplicar la cantidad de enzima polimerasa en la reacción de amplificación con los oligonucleótidos Lac1/Lac2-GC y Bif164F/Bif662-GC y mantener la mínima cantidad de enzima polimerasa en la amplificación con los oligonucleótidos 518R/341F-GC fueron las condiciones más eficientes de amplificación.
- El gradiente desnaturizante de urea formamida 40/60 seleccionado para separar electroforéticamente los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos 518R/341R-GC y Lac1/Lac2-GC y el gradiente desnaturizante 45/65 seleccionado para separar los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos Bif164F/Bif662-GC fueron los que permitieron mejor resolución de las bandas en los geles.
- La microbiota intestinal de los ratones que ingirieron kefirán presentaron un aumento en el número de bandas de los perfiles

---

electroforéticos de los productos de amplificación del ADN de contenido intestinal con oligonucleótidos dirigidos a Eubacterias en relación a los ratones control

- Se comprobó, mediante PCR-DGGE, que hay variabilidad en la microbiota intestinal entre ratones.
- Se determinó, mediante secuenciación, que una de las bandas presentes solamente en los ratones que ingirieron kefiran es *Bifidobacterium*.
- Mediante PCR-DGGE específica para el género *Bifidobacterium* se pudo evidenciar una modulación positiva para este género en el contenido intestinal de ratones que consumieron kefiran. Asimismo, no se evidenciaron cambios en la población de lactobacilos, mediante PCR-DGGE específica para este género.
- Estudios en la evolución de la microbiota fecal de ratones debido a la ingesta del kefiran confirmaron que, a pesar de la variabilidad propia de la microbiota de cada ratón, el kefiran produce cambios que se evidencian mediante el análisis de los perfiles DGGE.
- La población de bifidobacterias, evidenciada mediante un aumento de número de bandas en los perfiles PCR-DGGE (específica para bifidobacterias), cambió a partir del día 7 o 14 de ingesta de kefiran dependiendo del ratón analizado. Asimismo, no se evidenciaron cambios de la población de lactobacilos en microbiota intestinal de ratones que consumieron kefiran durante el tiempo del ensayo.
- Se pudieron cuantificar las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos mediante FISH-citometría. Como resultado de la



cuantificaron se obtuvo que los ratones del grupo control no mostraron variaciones en los porcentajes de bifidobacterias entre el inicio y el final del ensayo mientras que los ratones pertenecientes al grupo que ingirió kefiran duplican o triplican la cantidad de bifidobacterias en materia fecal entre el día 0 y 21.

- La modulación positiva de la población de bifidobacterias debido a la ingesta de kefiran se evidenció tanto en los análisis de contenido intestinal de colon como en los ensayos de evolución de microbiota fecal en el modelo ratón estudiado.
- El polisacárido producido por *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 no provocó cambios en las poblaciones no cultivables de lactobacilos y bifidobacterias.
- La ingesta de kefiran y el polisacárido producido por *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 no provocaron cambios significativos en el peso de los ratones que los consumieron.
- La población de lactobacilos y bifidobacterias viables en la materia fecal de los ratones que consumieron kefiran aumentó entre el inicio y el final del ensayo. Asimismo, la población de lactobacilos y bifidobacterias viables en materia fecal de ratones que consumieron el polisacárido producido por *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 disminuyó entre el inicio y el final del ensayo.
- El aumento en la población de bifidobacterias evidenciado mediante recuento de viables, FISH-citometría y PCR-DGGE en ratones que consumieron kefiran indicaría que éste polisacárido podría considerarse potencialmente prebiótico.