

***Contenido y estructura de  
arabinoxilanos de harinas integrales de  
diferentes genotipos de trigo.  
Evaluación de su capacidad prebiótica.***



Bioquímica Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Candela Paesani

ICYTAC (CONICET-UNC)

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba

Directora: Dra. Gabriela T. Pérez

ICYTAC (CONICET-UNC)

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba

Codirectora: Dra. Alicia Degano

CIQUIBIC (CONICET-UNC)

Centro de Investigaciones en Química Biológica Córdoba

Comisión Asesora de tesis:

Dra. Nicotra Viviana

IMBIV (CONICET-UNC)

Instituto multidisciplinario de Biología Vegetal

Dra. Amé Valeria

CIBICI (CONICET-UNC)

Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología



## LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

AP: actividad prebiótica

Ara: arabinosa

Ara/Xil: Índice arabinosa-xilosa

AX: arabinoxilanos

AX d: extracto de arabinoxilanos de trigos duros

AX b: extracto de arabinoxilanos de trigos blandos

AXOS: arabinoxilooligosacáridos

AXs: arabinoxilanos solubles

AXt: arabinoxilanos totales

Bac: *Bacteroides*

Bif: *Bifidobacterium*

CAA: Código Alimentario Argentino

C:2: ácido acético

C:3: ácido propiónico

C:4: ácido butírico

Cl: *Clostridium*

CG: cromatografía gaseosa

CR: crecimiento relativo

Ct: número de ciclos

Enco: *Enterococcus*

H: humedad

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPSEC: Cromatografía de exclusión de tamaño molecular de alta presión

IDF: fibra dietaria insoluble

IP: índice prebiótico

MANAVA: análisis de la varianza multivariado



MG: materia grasa

mut: mutante

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PM: peso molecular

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

PSA: distribución de Tamaño de Partícula

RTT: síndrome de Rett

SDF: fibra dietaria soluble

SNC: sistema nervioso central

TEA: trastorno de espectro autista

TM: tamaño molecular

wt: Wild type

Xil: xilosa

XOS: xilooligosacáridos



## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

Tabla 1. Composición centesimal de harinas de trigo	30
Tabla 2. Composición del medio de fermentación	66
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el análisis del perfil de microbioma	71
Tabla 4. Condiciones de amplificación de los oligonucleótidos	72
Tabla 5. Análisis de distribución de tamaño de partícula	85
Tabla 6. Composición fisicoquímica de las harinas integrales	87
Tabla 7. MANAVA entre trigos duros y blandos	88
Tabla 8. Correlación entre tamaño de partícula y composición	89
Tabla 9. Rendimiento y pureza de los extractos de arabinosanos	93
Tabla 10. Rendimiento y pureza de AX b y AX d	94
Tabla 11. Composición de azúcares de los extractos (CG)	95
Tabla 12. Composición de azúcares de los extractos (HPLC)	96
Tabla 13. Composición de los extractos AX b y AX d	97
Tabla 14. $\beta$ -glucanos en los extractos de AX	98
Tabla 15. Crecimiento relativo de las cepas bacterianas	106
Tabla 16. ANOVA de los CR de las cepas inóculadas	107
Tabla 17. Actividad prebiótica de las cepas bacterianas	108
Tabla 18. Correlaciones entre efecto prebiótico y composición	111
Tabla 19. CR, AP e IP de los extractos AX b y AX d	112
Tabla 20. Variación del peso e ingesta de comida de los ratones	131
Tabla 21. Correlación entre composición, AGCC y microbioma	140
Tabla 22. Correlación entre efecto prebiótico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	141
Tabla 23. Muestras de ratones para el análisis del perfil de microbioma	146
Tabla 27. MANAVA del perfil de microbioma entre RTT y wt	148



## FIGURAS

Figura 1. Gráfico de alimentación diaria	23
Figura 2. Esquema de la anatomía del grano de trigo	25
Figura 3. Elementos estructurales de los AX	35
Figura 4. Curvas de calibración para la cuantificación de azúcares	62
Figura 5. Curvas de calibración de los oligonucleótidos	73
Figura 6. Esquema del tratamiento <i>in vivo</i>	75
Figura 7. Distribución del tamaño de partícula de las harinas	83
Figura 8. Distribución de tamaño molecular de los extractos de AX	100
Figura 9. Distribución de tamaño molecular de AX b y AX d	101
Figura 10. Índice prebiótico	109
Figura 11. Variación de presión y pH durante la fermentación	117
Figura 12. Cantidad de probióticos al final de la fermentación	119
Figura 13. Concentración de AGCC a las 28 h de fermentación	120
Figura 14. Variación de ácido acético durante la fermentación	121
Figura 15. Variación de ácido propiónico durante la fermentación	122
Figura 16. Variación de ácido butírico durante la fermentación	123
Figura 17. Variación del tamaño molecular del AX b durante la fermentación	124
Figura 18. Variación del tamaño molecular de AX d durante la fermentación	125
Figura 19. Diferencias del tamaño molecular de los extractos a las 12 h	126
Figura 20. Variación del peso de los ratones durante el tratamiento	132
Figura 21. Diferencias entre los grupos bacterianos en materia fecal	133
Figura 22. Concentración de los grupos bacterianos en contenido cecal	135
Figura 23. Concentración de AGCC en contenido cecal	137
Figura 24. Perfil del microbioma intestinal en síndrome de Rett	147
Figura 25. Variación de la viabilidad celular de HCT 116 tratadas con AX b	153
Figura 26. Variación de la viabilidad celular de HCT 116 tratadas con AX d	154
Figura 27. Número final de células a las 72 h del ensayo de MTT	155
Figura 28. Tamaño molecular de AX b hidrolizado con xilanasa	157
Figura 29. Tamaño molecular de AX d hidrolizado con xilanasa	158
Figura 30. Diferencias de tamaño molecular entre los dos extractos	158



Figura 31. Variación de la viabilidad celular de HCT 116 con AX b hidrolizado	159
Figura 32. Variación de la viabilidad celular de HCT 116 con AX d hidrolizado	160
Figura 33. Número final de células a las 72 h con extractos hidrolizados	160



# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	21
1. TRIGO.....	24
1.1. <i>Textura del grano de trigo</i> .....	25
1.2. <i>Diferencias entre trigos duros y blandos</i> .....	26
1.3. <i>Harina de trigo</i> .....	27
2. COMPOSICION DE LAS HARINAS.....	29
2.1. <i>Lípidos</i> .....	30
2.2. <i>Proteínas</i> .....	31
2.3. <i>Carbohidratos</i> .....	32
3. ARABINOXILANOS Y EFECTO PREBIOTICO.....	34
3.1 <i>Estructura de los arabinoxilanos</i> .....	34
3.2 <i>Microbioma Intestinal</i> .....	36
3.3. <i>Compuestos Prebióticos</i> .....	40
3.4. <i>Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC)</i> .....	41
3.5. <i>Microbioma y el eje intestino-cerebro</i> .....	43
3.6. <i>La reconstitución del microbioma</i> .....	44
3.7. <i>Epigenética y microbioma intestinal</i> .....	45
4. SÍNDROME DE RETT.....	47
4.1 <i>Características clínicas</i> .....	47
4.2. <i>Etiología</i> .....	49
5. CANCER DE COLON.....	50
OBJETIVO GENERAL.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. MATERIAL VEGETAL.....	57
2. TAMAÑO DE PARTICULA DE LAS HARINAS.....	57
3. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS HARINAS.....	57
3.1. <i>Humedad</i> .....	57
3.2. <i>Cenizas</i> .....	58
3.3. <i>Proteínas</i> .....	58
3.4. <i>Materia grasa</i> .....	58
3.5. <i>Fibra Dietaria soluble e insoluble</i> .....	59
3.6. <i>Arabinoxilanos solubles y totales</i> .....	59
4. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AX.....	60
4.1. <i>Separación de AX solubles</i> .....	60
4.2. <i>Cuantificación y caracterización de AX</i> .....	61



5. EFECTO PREBIOTICO <i>IN VITRO</i> .....	63
5.1. <i>Cepas y medios</i> .....	63
5.2. <i>Efecto prebiótico in vitro</i> .....	64
6. FERMENTACION <i>IN VITRO</i> .....	65
6.1. <i>Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de la fermentación in vitro</i> .....	68
6.2. <i>Análisis de la variación de la distribución del peso molecular de los AXs durante la fermentación</i> .....	68
7. ANÁLISIS DEL PERFIL DEL MICROBIOMA INTESTINAL .....	68
7.1. <i>Extracción de ADN</i> .....	68
7.2. <i>Cuantificación de ADN</i> .....	69
7.3. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> .....	69
7.4. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)</i> .....	71
7.5. <i>Análisis del perfil del microbioma de ratones con Síndrome de Rett</i> .....	74
8. EFECTO PREBIOTICO <i>IN VIVO</i> .....	75
8.1. <i>Análisis del perfil del microbioma intestinal</i> .....	76
8.2. <i>Análisis de ácidos grasos de cadena corta en contenido cecal</i> .....	76
9. PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR EN CELULAS DE CANCER DE COLON..	76
9.1. <i>Línea celular de cáncer de colon</i> .....	76
9.2. <i>Ensayo de MTT ((4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro)</i> .....	77
9.3. <i>Hidrólisis de los extractos de AX</i> .....	77
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	78
RESULTADOS Y DISCUSION .....	79
CAPÍTULO 1 .....	81
COMPOSICION Y TAMAÑO DE PARTICULA DE LAS HARINAS DE GRANO ENTERO.....	81
1. TAMAÑO DE PARTICULA DE LAS MUESTRAS DE HARINA .....	83
2. COMPOSICION DE LAS HARINAS DE GRANO ENTERO .....	86
CAPÍTULO 2 .....	91
EXTRACCION DE AXs Y EVALUACION DE SU COMPOSICION.....	91
1. EXTRACCION DE LOS ARABINOXILANOS DE LAS HARINAS DE TRIGO INTEGRAL.....	93
CAPÍTULO 3.....	103
EVALUACION DEL EFECTO PREBIOTICO <i>IN VITRO</i> .....	103
1. EFECTO PREBIOTICO DE LOS EXTRACTOS DE AX <i>IN VITRO</i> .....	105
2. EVALUACION DE LOS EXTRACTOS DE AXs DE TRIGO DURO Y BLANDO .....	112
CAPÍTULO 4.....	115
FERMENTACION <i>IN VITRO</i> DE LOS AXs EN HECES HUMANAS .....	115



<i>CAPÍTULO 5</i> .....	129
<i>EFFECTO PREBIOTICO IN VIVO</i> .....	129
<i>CAPÍTULO 6</i> .....	143
<i>ANÁLISIS DEL PERFIL DEL MICROBIOMA INTESTINAL UN MODELO ANIMAL DE SÍNDROME DE RETT</i> .....	143
<i>CAPÍTULO 7</i> .....	151
<i>EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE ARABINOXILANOS SOLUBLES EN LA VIABILIDAD CELULAR EN LINEAS DE CANCER DE COLON</i> .....	151
CONCLUSIONES .....	163
REFERENCIAS .....	173



# INTRODUCCIÓN



Desde el punto de vista nutricional el consumo de cereales es de suma importancia, ya que proporcionan a la dieta hidratos de carbono complejos, fibra dietética, minerales y vitaminas del complejo B, y son de bajo contenido graso. El Ministerio de Salud de la Nación, a través de las guías de Alimentación saludable para la población argentina (<http://www.msal.gob.ar>) que publica en su portal, establece la importancia del consumo diario de alimentos a base de cereales.

Como puede observarse en la figura 1, la porción diaria recomendada de cereales, es del mismo tamaño que la de frutas y verduras, mostrando su gran importancia de los mismos. Se recomienda, a su vez, que el consumo de cereales se realice a base de productos integrales.



Figura 1. Gráfica de la Alimentación Diaria. Ministerio de Salud de la Nación 2016.

Se denominan productos a base de grano entero a los que poseen endosperma, germen y capa de la aleurona y pericarpio en las mismas proporciones que existen en el grano intacto previo a la molienda (AACC, 2000; FDA, 2010). En la actualidad, las pautas alimenticias recomiendan incrementar el consumo de productos a base de grano entero debido al rol que dichos granos ejercen en reducir el riesgo de enfermedad crónicas degenerativas (Bressiani *et al.* 2017; Liu, 2007).

Los alimentos a base de cereales han ocupado por milenios una parte muy importante de la dieta de los humanos. Los granos de cereales contienen macronutrientes, tales como proteínas, lípidos y carbohidratos, necesarios para el desarrollo y el mantenimiento de la salud de las personas. También aportan una importante cantidad

de minerales, vitaminas y otros micronutrientes esenciales para una buena salud (Liu, 2007). Sin embargo, desde hace años existe evidencia científica respecto a que los cereales tienen el potencial para mejorar la salud más allá de la provisión de los nutrientes antes mencionados, y que su consumo puede disminuir sustancialmente el riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con la dieta (Wu *et al.* 2011).

Siguiendo la nueva tendencia de comida saludable regida por pautas alimentarias, los cereales han recibido especial atención con el objetivo de minimizar pérdidas de compuestos saludables para el hombre que se eliminan en el proceso de molienda (Liu, 2007; Slavin, 2003). A pesar de sus efectos benéficos, la aceptación por parte de los consumidores es limitada debido a que poseen sabor y textura característicos de dichos productos por la presencia de salvado y germen (Dammann *et al.* 2013).

## **1. TRIGO**

El trigo es uno de los cereales más importantes en el mundo en términos de cultivo y alimentación humana, y el cereal más importante en el consumo de la población argentina (FAO: Food Balance Sheet, 2015). Es el segundo en producción mundial, después del maíz y se encuentra entre los tres cereales que mayor rango geográfico y climático tiene para su producción (FAOSTAT, 2015).

El grano de trigo se encuentra constituido por tres partes principales: el salvado, el germen o embrión, y el endosperma (Marquart *et al.* 2007) (figura 2). El salvado está constituido por 4 capas celulares: pericarpio (epidermis, hipodermis, células horizontales y tubulares), recubierta de la semilla, tejido nuclear y células de la aleurona, cuyas células tienen un alto contenido de celulosa y hemicelulosa, estructuras que rodean al endosperma y son eliminados durante la molienda del grano a la hora de obtener harina blanca refinada (Hemery *et al.* 2009). El germen constituye un porcentaje pequeño del grano, relativamente rico en proteínas, azúcares y aceite, y por esta razón es eliminado de la harina con el fin de evitar el enranciamiento (Hoseney, 1994a). Por último, el endosperma, está formado por células repletas de gránulos de almidón incluidos en una matriz proteica constituida por proteínas de reserva, que, en el caso del trigo, constituyen el gluten y proteínas metabólicamente activas (Gómez Pallarés *et al.* 2007; Pomeranz, 1971).

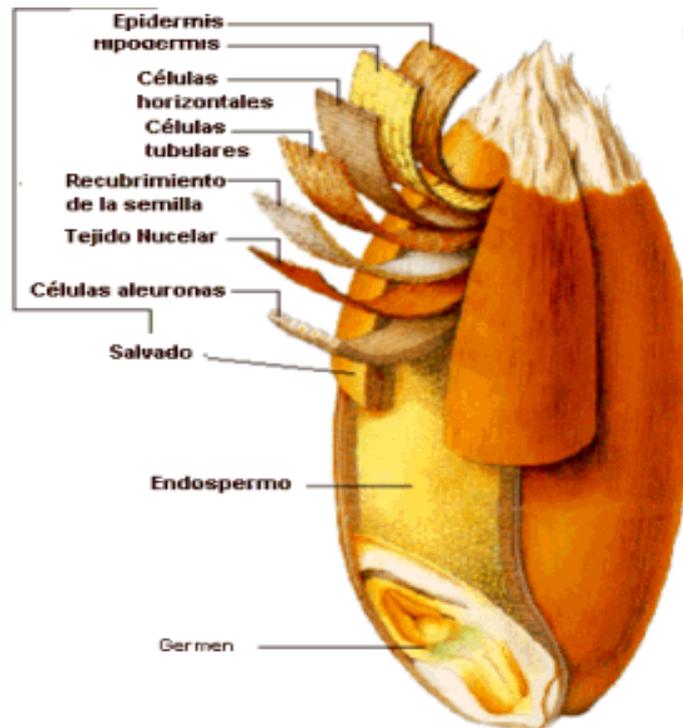


Figura 2. Esquema de la anatomía del grano de trigo

### 1.1. Textura del grano de trigo

La dureza del grano puede ser definida como la resistencia a la deformación o propiedades de fractura y la distribución del tamaño de partícula de la harina, después de la molienda. Es una de las principales características para clasificar el trigo y determinar el uso final de sus harinas (Campbell *et al.* 2001; Khan *et al.* 2000).

Según la textura del grano, los trigos pueden dividirse en tres clases principales: blandos, duros hexaploides (*Triticum aestivum* L.) y extra duros tetraploides (*Triticum durum*) o candeales. El grado de dureza está relacionada con la forma en que el endosperma se rompe afectando la facilidad con que el endosperma se separa del salvado (Campbell *et al.* 2001).

En los trigos duros esta separación es más limpia y las células del endosperma permanecen intactas. Sin embargo, en los trigos blandos las células periféricas del endosperma tienden a fragmentarse y mientras unas se separan, otras quedan unidas al salvado (Gómez Pallarés *et al.* 2007). Los trigos extra duros producen una harina con mayor granulometría (sémola o semolina), arenosa y formada por partículas de forma regular que son, en su mayoría, células enteras del endosperma.

En la molienda, la textura del grano afecta los requerimientos de acondicionamiento del trigo, el tamaño de la partícula y la densidad de la harina, el contenido de almidón dañado, la absorción de agua y el rendimiento en el molino (Osborne *et al.* 2005 y 2006; Delwiche, 2000). Generalmente, las harinas de trigo duro son de textura tosca, contienen más almidón dañado, el cual aumenta la absorción de agua inicial y evita la óptima formación de gluten durante el amasado. También disminuye la consistencia de la masa perdiendo la capacidad de retención de gas después de la degradación del almidón durante la fase de fermentación (Barrera *et al.* 2006). Las harinas de trigo blando son de textura más fina, poseen gran número de gránulos de almidón intactos y son usadas para elaborar galletitas, tortas y otros productos no esponjados (Campbell *et al.* 2001). Las harinas de trigo candeal presentan un incremento adicional de la dureza, lo cual produce harinas con textura más tosca denominadas semolinas y altos niveles de almidón dañado. Este tipo de harinas es generalmente usado para pastas (Fu-min, 2009; Giroux y Morris, 1998).

### **1.2. Diferencias entre trigos duros y blandos**

La textura del grano está determinada genéticamente y controla el grado de adhesión entre la matriz proteica y los gránulos de almidón del endosperma (Campbell *et al.* 1999). Es una característica expresada en el desarrollo temprano, cuando hay muy poco almacenamiento de proteínas y los gránulos de almidón están presentes en las células del endosperma (Bechtel *et al.* 1996). Entre otros factores que afectan la dureza final del grano, podemos mencionar el contenido de humedad, la presencia de materiales solubles en el agua de la semilla, así como el contenido de lípidos y pentosanos.

La dureza del grano es una característica que juega un importante papel en la comercialización y el procesamiento del trigo tanto nacional como internacional. En general, la dureza se piensa como el resultado de la fuerza de las interacciones almidón-proteína (Barlow *et al.* 1973). El endosperma blando se relaciona con la presencia de las friabilinas (Greenwell y Schofield 1986; Schofield, 1994), y la presencia de dos clases de glico- y fosfolípidos polares unidos al almidón. Greenblatt *et al.* (1995) sugiere que la interfaz de almidón debe desempeñar un papel importante en determinar la textura del grano de trigo. Características físicas del grano de trigo, como la uniformidad en la dureza y el tamaño del grano son importantes para la molienda de harina de trigo tradicional porque maximizan la separación del salvado del endosperma en el molino de rodillos (Posner y Hibbs, 2005; Li y Posner, 1987), para la obtención de harina blanca.

Macroscópicamente, la morfología de los granos de trigos duros y blandos es similar. La superficie de corte de un cultivar duro a menudo se puede distinguir de un cultivar blando por el contenido vítreo en la superficie cortada, pero esto no siempre se ajusta rigurosamente a la textura del grano. Se ha reportado que la resistencia a la compresión del endosperma de trigo duro es mucho más sensible al contenido de humedad que el endosperma de trigo blando (Delwiche, 2000; Glenn y Saunders, 1990).

En general, el trigo duro se usa para pan, mientras que el trigo blando se usa para galletas, bizcochuelos y pasteles (Campbell *et al.* 2001; Morris *et al.* 1996). En la actualidad, Argentina es productor de trigo duro hexaploide, de muy buena calidad panadera, pero el cultivo de trigo blando no está extendido por temor que se produzcan mezclas con trigos panificables que afecten la calidad panadera de este último. Por este motivo, los trigos blandos no se cultivan en la Argentina y la industria galletitera utiliza harina de trigos panaderos con el agregado de aditivos o enzimas para reducir la fuerza del gluten que logran imitar las propiedades del trigo blando (Moiraghi *et al.* 2011).

Las líneas de trigo blando que se cultivaron hasta el año 2012 eran variedades extranjeras y no presentaban una buena adaptación a los suelos y ambientes argentinos. Actualmente existen en el país 4 variedades de trigo inscriptas para su cultivo, y una de estas ha sido desarrollada en el país por INTA e inscripta en 2012 (variedad Biointa 3007 BB). Desde hace dos años Molino Campodónico cultiva y comercializa unas 2000 toneladas de trigo blando (variedad QALBis) en el país para Terrabusi (Kraft Foods) y algunas empresas más pequeñas (com. pers. Miguel Cardos, Molino Campodónico, 2013).

### **1.3. Harina de trigo**

La harina de trigo es la única con la habilidad de formar masas cohesivas tras el agregado de agua, capaces de retener gases durante la fermentación y el horneado y dar productos aireados y livianos. Estas características particulares se deben a su composición química, y en especial a sus proteínas y su capacidad de formar gluten (Campbell *et al.* 2001).

El Código Alimentario Argentino (CAA) clasifica: (Artículo 662 - Dec. 2370, 28.3.73)

- "Con la denominación de Harina, sin otro calificativo, se entiende el producto obtenido de la molienda del endosperma del grano de trigo que responda a las exigencias de éste. Las harinas tipificadas comercialmente con los calificativos: cuatro ceros (0000),

tres ceros (000), dos ceros (00), cero (0), medio cero (medio 0), Harinilla de primera y Harinilla segunda, corresponderán a los productos que se obtienen de la molienda gradual y metódica del endosperma en cantidad de 70-80% del grano limpio.

- "Se entiende por Harina integral o Harina de Graham, el producto que se obtiene por la molienda del grano de trigo que responda a las exigencias de éste. Según el grado de la molienda se admiten y distinguen tres tipos: Gruesa, Mediana y Fina. Estos productos se rotularán: Harina integral o Harina de Graham. Por debajo y con caracteres semejantes a los empleados en su denominación, la tipificación que les corresponda: Gruesa, Mediana o Fina".

Con el advenimiento de los modernos molinos de rodillos durante la revolución industrial, la producción de harina de trigo integral casi desapareció durante gran parte del siglo XX. En los Estados Unidos, la producción de harina de trigo integral fue de alrededor del 2% de la producción total de harina en el año 2000 (Vocke *et al.* 2008) y sólo alrededor del 7% de la población consumía al menos 3 porciones de granos enteros por día (USDA, 2000). Además, la harina de trigo integral contiene mayor actividad enzimática (Every *et al.* 2006b), lípidos (Chung *et al.* 2001) y antioxidantes (Adom *et al.* 2005) que la harina refinada, lo cual puede afectar el uso final (Every *et al.* 2006a) y las propiedades de almacenamiento de la misma (Heinio *et al.* 2002)

Diversos estudios han asociado el consumo habitual de cereales de grano entero con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes de tipo 2, algunos tipos de cáncer, así como con una menor tasa de obesidad; efectos que son atribuidos a la composición de estos alimentos (Bressiani *et al.* 2017; Liu, 2007). El pan integral, al tener más fibra que el pan blanco, ofrece una mayor sensación de saciedad, favorece la función intestinal, previene y alivia el estreñimiento, tiene la capacidad de modular de manera favorable para la salud el microbioma y el tránsito intestinal (Sánchez *et al.* 2005).

El germen contiene ácidos grasos esenciales de tipo omega-3 que ayudan a disminuir el colesterol sérico (Pirini *et al.* 2007); asimismo contiene algunas vitaminas del grupo B, muy importantes para el funcionamiento del sistema inmunológico, sistema nervioso, producción de hormonas o formación y crecimiento correctos del feto durante el embarazo (ácido fólico); vitamina E, con importante actividad antioxidante; fibra, para prevenir el estreñimiento y distintos tipos de cáncer (Caers *et al.* 2000); minerales como calcio, hierro o fósforo y proteínas.

La mayoría de los productos a base de trigo consumidos en Argentina se elaboran con harina blanca, compuesta principalmente por el endosperma, mientras que las capas de aleurona, germen y las capas externas del grano (pericarpio y testa) son descartadas (Shewry *et al.* 2010).

Sin embargo, en lo que respecta a los compuestos de alto valor nutricional como los minerales, se encuentran en mayores concentraciones en el salvado (Vignola *et al.* 2017; Dewettinck *et al.* 2008). Componentes con potenciales beneficios para la salud como compuestos fenólicos, carotenoides y tocoferoles se concentran también en la capa de aleurona y en el pericarpio y el germen, aunque en menor medida (Fulcher y Duke, 2002; Ragae y Abdel-Aal, 2006).

## **2. COMPOSICION DE LAS HARINAS**

La molienda del trigo consiste en la trituración del grano con objeto de obtener un tamaño de partícula más apto para las distintas aplicaciones industriales y culinarias. El sistema de molturación por cilindros se basa en el paso del trigo a través de parejas de cilindros que van reduciendo el tamaño de partícula progresivamente. Tras cada pasada el producto resultante es sometido a cribados especiales para eliminar el salvado y el germen cuando se obtiene harina refina, a diferencia de la harina de grano entero. Tras cada paso por parejas de rodillos el producto obtenido pasa por equipos especiales llamados *plansifters* (baterías de cribas) y sasores (mezcla de cribado y aspiración) para separar las distintas fracciones. Las fracciones más gruesas (salvado con endospermo adherido) se dirigirán hacia la siguiente pareja de rodillos de trituración. Las fracciones intermedias se dirigirán hacia los molinos de compresión para reducir el tamaño de partícula, y las fracciones que tengan la finura de la harina se dirigirán al silo de producto final correspondiente (León y Rosell, 2006). A cada una de estas fracciones, con la granulometría propia de las harinas finales se les denomina pasadas de molienda. La unión de estas pasadas de molienda, junto con las obtenidas en la fase de reducción, constituye la harina final. No obstante, cada pasada de molienda difiere en su composición del resto, especialmente en los porcentajes y tipos de proteínas (Menkovska *et al.* 2002, Sutton y Simmons 2006, Wang *et al.* 2006) por lo que la separación de las fracciones permite obtener harinas de distintas calidades a partir de un mismo tipo de trigo.

En el caso de las harinas de grano entero, el producto final contiene todas las fracciones sin realizar ningún tipo de separación entre ellas, y son más ricas en nutrientes debido a la presencia del salvado y el germen (Tabla 1).

La composición centesimal de harinas blancas e integrales se muestra en la siguiente tabla tomada del libro “De tales harinas, tales panes” (León y Rosell, 2006).

Tabla 1. Composición nutricional de la harina de trigo (por 100 g de producto)

	Harina blanca	Harina integral
calorías (kcal)	361	339
hidratos de carbono (g)	72,5	72,5
Proteínas (g)	11,9	13,7
materia grasa (g)	1,66	1,87
Cenizas (g)	0,47	1,60
fibra dietaria (g)	2,4	12,2

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de harinas integrales debido a su mayor valor nutricional y al aporte de fibra. Estas harinas pueden obtenerse mediante la molturación del grano entero en molinos de piedras o de martillos. Sin embargo, la mayoría de harinas integrales presentes en el mercado se elaboran mezclando la harina blanca con la correspondiente cantidad de salvado. El salvado puede incorporarse con distintos tamaños de partícula. En estas harinas no se suele incorporar el germen, debido a los problemas de enranciamiento que presenta y la consiguiente reducción de la vida útil de la harina (Galliard, 1986).

## **2.1. Lípidos**

El grano de trigo contiene una cantidad relativamente pequeña de lípidos con diferente estructura química y composición. En el patrón de ácidos grasos de los lípidos de la harina de trigo se encuentran mayoritariamente el ácido linoleico y, en menor cantidad, el ácido palmítico, oleico y linolénico (Prabhasankar y Rao, 2001; Eliasson y Larsson, 1993).

Se almacenan principalmente en el germen y la capa de aleurona, mientras que los fosfolípidos y glucolípidos se encuentran en el endosperma. Se pueden encontrar libres o unidos a otro constituyente de la harina, como almidón y proteínas. Los lípidos

asociados al almidón comprenden en gran parte a los fosfolípidos que forman complejos de inclusión con la amilosa durante la gelatinización del almidón, sin embargo, estos complejos también se encuentran en el almidón nativo del cereal (Doblado-Maldonado, *et al.* 2012; Morrison *et al.* 1993).

Durante el desarrollo de la masa, los lípidos que se encuentran libres se asocian a las proteínas del gluten mediante interacciones específicas, modificando las propiedades reológicas de la masa. En particular, los lípidos polares (especialmente los glucolípidos) pueden promover tanto interacciones hidrofóbicas como hidrofílicas entre el gluten y el almidón (Goesaert *et al.* 2005; Matsuo *et al.* 1986).

## **2.2. Proteínas**

Osborne (1907) fue el primero en separar sistemáticamente las proteínas del trigo en cuatro fracciones, basándose en las diferencias de solubilidad: llamando albúminas a las proteínas solubles en agua, globulinas a las proteínas solubles en soluciones salinas diluidas, gliadinas a las solubles en alcohol y gluteninas a las solubles en soluciones ácidas o básicas diluidas (Ortiz-Martinez *et al.* 2017). Chen y Bushuk (1970) revelaron que sólo una parte de las gluteninas son solubles en ácido acético diluido, y así diferenciaron dos fracciones proteicas: una soluble y una insoluble. Posteriormente, Orth y Bushuk (1972) encontraron una correlación positiva entre la cantidad de gluteninas insolubles en ácido acético y el volumen de pan, por lo que esta fracción se transformó en la clave para explicar diferencias en la fuerza de la masa y en la calidad panadera (Khan y Bushuk, 1979). El uso de detergentes y solventes orgánicos permitió una mejor separación concluyendo que la insolubilidad de las proteínas era debido al tamaño y al alto grado de polimerización de los agregados proteicos (Graveland *et al.* 1980).

De acuerdo a la funcionalidad, estas proteínas se pueden clasificar en dos grandes grupos, las proteínas capaces de formar el gluten y aquellas que no lo forman (van den Broeck *et al.* 2009; Pomeranz, 1971).

Las proteínas que no forman gluten representan entre un 15-20% del total de las proteínas del trigo, son solubles en soluciones salinas diluidas, por lo tanto, corresponden a las albúminas y globulinas del fraccionamiento de Osborne. Son proteínas monoméricas, metabólicamente activas y/o estructurales que se ubican en las capas más externas del grano de trigo. Su función en la panificación no está clara aún (Veraverbeke y Delcour, 2002). Estas proteínas poseen un buen balance de aminoácidos, contienen proporciones relativamente altas de lisina, triptófano y

metionina; tres aminoácidos que se encuentran en baja proporción en la mayoría de los cereales.

Las proteínas formadoras de gluten, que son las proteínas de almacenamiento del grano (van den Broeck *et al.* 2009; Kasarda *et al.* 1976), constituyen la mayor parte del total de las proteínas del trigo (80-85%) y sirven como fuente de nitrógeno durante la germinación de la semilla (Larroque *et al.* 2000; Ng y Bushuk, 1987). Se encuentran en el endosperma del grano de trigo maduro, donde forman una matriz continua alrededor de los gránulos de almidón. Las proteínas del gluten son insolubles en agua o en soluciones salinas diluidas y pueden ser divididas en dos grupos de acuerdo con su funcionalidad: las gliadinas monoméricas y las gluteninas poliméricas (extraíbles o no extraíbles). La composición de aminoácidos de las gliadinas y de las gluteninas es similar, se caracterizan por tener altas concentraciones de glutamina (un tercio o más del residuo total de aminoácidos) y de prolina (una séptima parte o más del residuo total de aminoácidos). En general, se considera que las gliadinas son las responsables de la viscosidad del gluten, mientras que las gluteninas son las encargadas de conferirle fuerza y elasticidad (Khatkar *et al.* 2002; Hosney, 1994a).

## **2.3. Carbohidratos**

### *2.3.1. Almidón*

Las semillas de los cereales almacenan energía en forma de almidón. La cantidad de almidón presente en el grano de trigo es variable, pero por lo general oscila entre el 60 y el 75% del peso del grano. Además de su importancia energética, el almidón es utilizado en la industria alimentaria por el efecto que éste ejerce sobre las propiedades físicas de los alimentos.

El almidón está compuesto por dos tipos de polímeros de  $\alpha$ -D-glucosa, diferenciados por su estructura química en amilosa y amilopectina con una relación amilosa/amilopectina entre 25-28% y 72-75% respectivamente. La amilosa, que es un polímero esencialmente lineal compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4), con escasos puntos de ramificación formados por enlaces  $\alpha$ -(1-6) (Shibanuma *et al.* 1994); y la amilopectina que está formada por una cadena central similar a la de la amilosa pero posee ramificaciones con enlaces  $\alpha$ -(1-6) cada 9 a 20 unidades de D-glucosa (Whilster y Daniel, 1984).

Es ampliamente conocido que en los granos de trigo el almidón se deposita en dos tipos de gránulos: los gránulos tipo A y tipo B que presentan una distribución bimodal (Peng *et al.* 1999; Evers y Lindley, 1977) y se pueden clasificar según su biosíntesis, tamaño y forma. Los gránulos tipo A poseen un diámetro mayor a 10  $\mu\text{m}$  con forma lenticular mientras que los gránulos tipo B poseen un tamaño menor ( $<10 \mu\text{m}$ ) con forma esférica (Peng *et al.* 1999). Mientras que los gránulos tipo A representan la mayor proporción del peso del endosperma (50-90%), los gránulos tipo B predominan en número (más del 99%) (Shinde *et al.* 2003). La integridad de los gránulos de almidón en el endosperma del trigo puede ser afectada por las operaciones mecánicas como la molienda. Durante este proceso, una fracción de los gránulos de almidón es dañada, produciendo así lo que se denomina como almidón dañado. El nivel de almidón dañado depende de factores genéticos y ha demostrado tener muy poca variación entre trigos del mismo cultivar (Baevre, 1999). El nivel de daño que sufren los gránulos de almidón está relacionado directamente con la dureza del grano de trigo y con las condiciones y tipo de molienda; cuanto mayor sea la resistencia que ofrezcan los granos a la molturación, mayor será el contenido de almidón dañado presente en la harina (Hoseney, 1994a). El contenido de almidón dañado que regularmente presentan las harinas de trigo ronda alrededor del 5-13%, dependiendo de las características del trigo y de las condiciones de molienda.

### 2.3.2. Fibra dietética

La fibra dietética se define como “la parte consumible de la planta o carbohidrato análogo que es resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso” (Mongeau, 2003; Trowell *et al.* 1976). Esta definición incluye un amplio rango de compuestos no digeribles como, celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón resistente pero también incluye componentes no polisacáridos como lactosa, rafinosa, fructooligosacáridos, lignina entre otros, que escapan también a la digestión y absorción en el intestino delgado, y, por lo tanto, funcionan como fibra dietética (Manning y Gibson, 2004). La fibra dietética se clasifica en dos categorías de acuerdo con su solubilidad en agua: fibra dietética insoluble (celulosa, parte de hemicelulosa y lignina) y soluble (pentosanos, pectinas, mucilago, gomas) (Esposito *et al.* 2005).

La fibra dietética, en general, tiene propiedades tales como: disminución del tiempo de tránsito intestinal, reduce el nivel de colesterol total y/o colesterol LDL y los niveles de

glucosa postprandial y de insulina (Chaplin, 2003). La fibra soluble forma una dispersión en agua que conlleva a la formación de geles viscosos en el tracto gastrointestinal que tienen la propiedad de retardar la evacuación gástrica, puede ser saludable en algunos casos, haciendo más eficiente la digestión y absorción de alimentos y generando mayor saciedad. Este tipo de fibra es altamente fermentable y se asocia con el metabolismo de carbohidratos y lípidos (De la Llave, 2004). La fibra insoluble aumenta el volumen de las heces hasta 20 veces su peso, debido a su capacidad de retención de agua, y se relaciona con la protección y alivio de algunos trastornos digestivos como estreñimiento y constipación (Blackwood *et al.* 2000).

Uno de los compuestos que se encuentran dentro de las fibras alimentarias que contiene el trigo son los arabinosilanos, en los cuales centraremos el objetivo de este trabajo.

### **3. ARABINOXILANOS Y EFECTO PREBIOTICO**

#### **3.1 Estructura de los arabinosilanos**

Los arabinosilanos (AX) son los principales polisacáridos no amiláceos en las paredes celulares de los cereales y forman parte de la fibra dietética. Los AX se clasifican según su solubilidad en agua extraíble y agua no extraíble. Entre el 25 y el 33% de los AX del trigo son solubles en agua a temperatura ambiente, el resto es insoluble y puede extraerse con soluciones alcalinas. Los AX están formados por cadenas de xilosa (Xil) unidas por un enlace  $\beta$ 1-4, sustituido por unidades de arabinosa (Ara) unidas por enlaces  $1\alpha$ -2 y  $1\alpha$ -3 a lo largo de la cadena de xilosa. (Grootaert *et al.* 2009; Mendis y Simsek, 2014). Los ácidos fenólicos, como el ácido ferúlico, puede esterificar los hidroxilos de la posición C-5 de la arabinosa (figura 3). Las xilosas pueden estar di sustituidas, mono sustituidas y no sustituidas (aproximadamente 13, 21 y 66% respectivamente), aunque todavía no está claro cómo estas proporciones influyen en la naturaleza heterogénea de los AX (Saulnier *et al.* 2007).

En el grano de trigo, la concentración de arabinosilanos varía dependiendo del cultivar y el tejido del grano del que se trate, constituyendo el 20-27% de la aleurona, el 23-32% del salvado y el 2-4% del endosperma (Pomeranz, 1988).

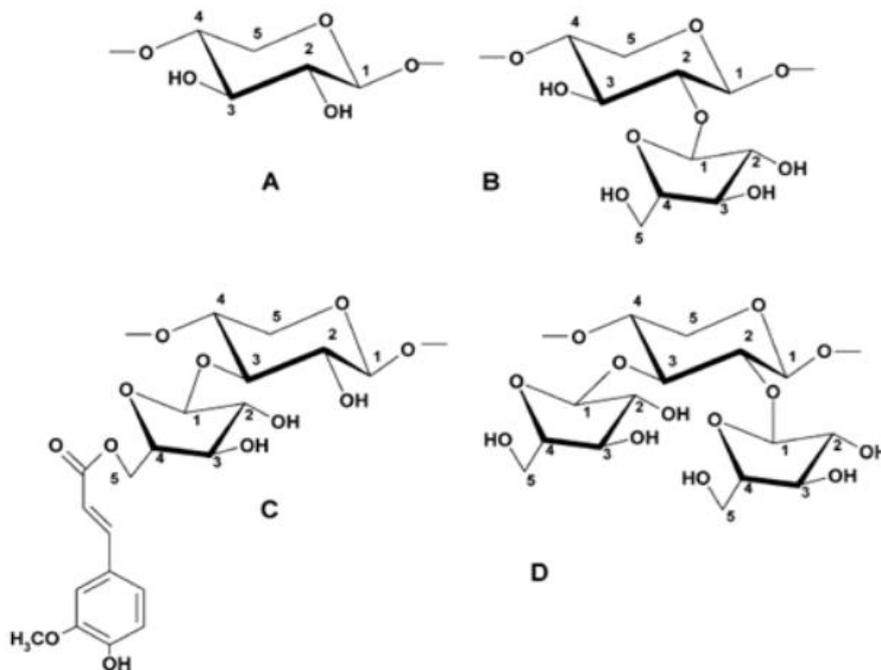


Figura 3. Elementos estructurales de los arabinoxilanos. (A) Residuo de D-Xilosa no sustituida. (B) Residuo de D-Xilosa sustituida en el C-2 con un residuo de D-arabinosa. (C) Residuo de D-Xilosa sustituida en el C-3 con un residuo de D-arabinosa que tiene unido al C-5 una molécula de ácido ferúlico. (D) Residuo de D-Xilosa sustituida en el C-2 y C-3 con residuos de D-arabinosa.

En general, los AX insolubles del salvado de trigo consiste en una columna vertebral de unidades de xilopiranosilo con enlaces (1-4) a los que la arabinofuranosa está unida en las posiciones C-3, C-2 o ambas y pueden tener un ácido urónico en la posición C-2 (Schooneveld-Bergmans *et al.* 1999). Dado que el salvado de trigo se compone de diferentes tejidos, la estructura de los AX en el salvado de trigo es muy diversa. Los AX solubles del salvado de trigo se encuentran menos sustituidos con arabinosa que los del endosperma interno. Los AX en salvado de trigo contienen una población poco sustituida con una proporción de arabinosa y xilosa (Ara/Xil) de 0,2 y una población altamente sustituida con una relación Ara/Xil cercana a 1,0 (Schooneveld-Bergmans *et al.* 1999).

Andrewartha *et al.* (1979) sugirió que la alta viscosidad de las soluciones de arabinoxilanos se debe a la conformación en forma de varilla rígida que forman los polímeros, causada por una relación relativamente alta de arabinosa/xilosa. Es asumido que, un aumento en el contenido de arabinosa parece "endurecer" la columna vertebral de xilosa. No hay mucha información, sin embargo, en cuanto a la relación que puede existir entre las características estructurales y las macromoleculares. Los trabajos que

han realizado investigación en esta área, arrojan resultados que son contradictorios (Meuser y Suckow, 1986; Hosoney, 1984a; Ali y D'Appolonia, 1979). Una razón para tales resultados contradictorios puede estar en diferencias en la pureza y composición de las muestras de arabinosilanos utilizadas (Dervilly *et al.* 2000).

La hidrólisis enzimática de los AX produce distintos oligosacáridos que constan de arabinosilooligosacáridos (AXOS) y xilooligosacáridos (XOS). Esta reacción tiene lugar en la producción de AXOS de productos alimenticios derivados de cereales, como pan y cerveza, así como en el colon tras la ingesta de los AX (Grootaert *et al.* 2009; Van den Abbeele *et al.* 2011). Los arabinosilooligosacáridos se caracterizan por su grado medio de sustitución de arabinosa y su menor grado medio de polimerización (Broekaert *et al.* 2011). Los XOS están compuestos de oligómeros de xilosa unidos a través de enlaces  $\alpha$ - (1-4), que es resistente a la digestión en el intestino delgado humano (Aachary y Prapulla, 2008).

Los arabinosilanos constituyen una fracción de fibra dietética que tienen múltiples efectos sobre el sistema digestivo humano, estimulando el desarrollo de bacterias probióticas del microbioma intestinal (Crittenden *et al.* 2002), las cuales fermentan los mismos en el intestino grueso, generando ácidos grasos de cadena corta que disminuyen la cantidad de lipoproteínas de baja densidad que transportan colesterol (LDL) sintetizadas en el hígado y mejoran así la absorción de sustancias minerales tales como iones calcio o magnesio (López *et al.* 1999). Los arabinosilanos aumentan significativamente el potencial de activación de células B y T, y aumenta la inmunidad humoral y mediada por células en ratones portadores de tumores (Akhtar *et al.* 2012).

### **3.2 Microbioma Intestinal**

Se denomina microbioma al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos en un nicho ecológico determinado se le denomina microbioma. El microbioma humano se refiere a la población total de microorganismos, con sus genes y metabolitos, que colonizan el cuerpo humano, incluyendo el tracto gastrointestinal, el genitourinario, la cavidad oral, la nasofaringe, el tracto respiratorio y la piel (Petrosino *et al.* 2009). El nicho microbiano residente en el intestino humano es una de las comunidades más densamente pobladas (Ruiz *et al.* 2012). El intestino humano, en especial el intestino grueso o colon, conforma un ecosistema peculiar en el que conviven millares de especies diferentes de microorganismos. Diversos estudios han demostrado

que la flora bacteriana tiene una función moduladora sobre diferentes aspectos de la función digestiva (Viladomiu *et al.* 2013; Wu *et al.* 2011).

En el intestino grueso de los mamíferos la cifra de microorganismos se eleva a  $10^{12}$  -  $10^{14}$ . Este número es mayor, incluso, que el de células del cuerpo humano (Whitman *et al.* 1998). El ecosistema microbiano del intestino (microbiota intestinal) incluye muchas especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal, y una serie variable de microorganismos que sólo lo hacen de manera transitoria.

En los últimos años, el microbioma intestinal está siendo considerado como un socio simbiótico para el mantenimiento de la salud (Qin *et al.* 2010). Varios datos sugieren que la actividad del mismo es un factor a tener en cuenta al evaluar los factores de riesgo relacionados a la obesidad y trastornos asociados, como la dislipidemia, inflamación, resistencia a la insulina y diabetes, entre otros (Geurts *et al.* 2011; Delzenne y Cani, 2011; Delzenne *et al.* 2011; Backhed *et al.* 2010; Caesar *et al.* 2010; Diamant *et al.* 2010; Ley, 2010).

El microbioma intestinal ha pasado de considerarse un comensal acompañante, a considerarse un órgano metabólico (Macpherson *et al.* 2001), con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica (O'Hara *et al.* 2006). Los mamíferos que crecen libres de gérmenes tienen un desarrollo corporal anormal, con pared intestinal atrófica, corazón, pulmones e hígado de bajo peso y sistema inmune inmaduro con niveles bajos de inmunoglobulinas (Macpherson *et al.* 2001).

Existe un delicado equilibrio entre el intestino humano y su microflora. El desequilibrio de esta comunidad puede conducir a los síntomas de la gastroenteritis aguda y a la posibilidad de trastornos crónicos como enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer de colon, entre otras. Muchos factores ambientales diferentes pueden afectar la ecología microbiana intestinal; éstos incluyen dieta, medicamentos, estrés, edad y condiciones generales de calidad de vida (Gibson y Fuller, 2000). El término "disbiosis" se refiere a situaciones en las que la composición de los microorganismos se desplaza de su beneficio normal a un estado que es perjudicial para la salud del huésped que incluso puede afectar negativamente el funcionamiento del SNC.

Así mismo, la flora intestinal tiene un efecto modulador sobre la permeabilidad y la función barrera de la mucosa intestinal, lo que representa un mecanismo defensivo importante contra la colonización bacteriana y translocación bacterianas. Así, se ha demostrado que *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus helveticus* mejoran la función barrera de la mucosa intestinal, inhiben la adhesión y crecimiento de las bacterias

patógenas intestinales y mejoran la respuesta inmunológica disminuyendo la inflamación (Wallace *et al.* 2003).

Las bacterias intestinales también condicionan la composición del contenido de la luz intestinal, especialmente el contenido de gas. Así, cuando se ingieren hidratos de carbono no absorbibles (fibras), el microbioma del colon produce una fermentación que condiciona un incremento en la osmolaridad intestinal, y la producción de gases intestinales, especialmente hidrógeno y gas metano (Karppinen *et al.* 2000). Mediante el proceso de fermentación, las bacterias intestinales metabolizan varios sustratos (principalmente componentes dietéticos) obteniendo productos finales tales como ácidos grasos de cadena corta y gases. Se cree que este metabolismo anaerobio contribuye positivamente hacia los requisitos diarios de energía del huésped. Las bacterias que componen el microbioma intestinal tienen enzimas que transforman a los polisacáridos complejos de la dieta, que el intestino humano no puede digerir ni absorber, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico.

El microbioma es indispensable para el correcto crecimiento corporal, el desarrollo de la inmunidad y la nutrición. Las alteraciones en el microbioma podrían explicar, por lo menos en parte, algunas epidemias de la humanidad como el asma y la obesidad (Delzenne y Cani, 2011). La disbiosis se ha asociado a una serie de trastornos gastrointestinales que incluyen el hígado graso no alcohólico, la enfermedad celíaca y el síndrome de intestino irritable. El microbioma define y modula la homeostasis del hospedador determinando el equilibrio nutricional, inmunológico y neuroendócrino (Bakhtiar *et al.* 2013; Salvucci *et al.* 2016). El desequilibrio está particularmente asociado con numerosas enfermedades inflamatorias e inmunológicas emergentes (Bakhtiar *et al.* 2013).

Aun cuando el microbioma intestinal cambia con el paso de los años, el medio ambiente y la carga microbiana materna durante el parto, y la alimentación con leche materna parecen permanecer como factores muy importantes en el desarrollo futuro de éste. Una vez establecido en un individuo, no se modifica drásticamente en el tiempo (Costello *et al.* 2009). Se ha reportado que, en humanos, los miembros de la misma familia tuvieron comunidades bacterianas más parecidas entre ellos que en comparación con individuos no relacionados (Costello *et al.* 2009).

Evolutivamente, en los mamíferos, los organismos que componen el microbioma, son determinados por los tipos de fuentes nutricionales, siendo diferentes los perfiles de omnívoros, carnívoros y herbívoros (Ley *et al.* 2008). Las características de la dieta,

junto con los factores genéticos, influyen en el predominio de algunos microorganismos sobre otros (Ducan *et al.* 2008). En diferentes poblaciones estudiadas se ha demostrado que después de tan sólo un día de dieta de tipo occidental (alta en grasa y azúcar y baja en polisacáridos de las plantas), los ratones muestran cambios en su composición microbiana y en sus vías metabólicas, y en 2 semanas desarrollan mayor adiposidad (Turnbaugh *et al.* 2009). La abundancia o escasez de alimento también determinan la presencia o ausencia de especies bacterianas que se reproducen mejor cuando hay disponibilidad ilimitada de alimentos, o de especies más eficientes cuando los nutrientes son escasos (Ducan *et al.* 2008; Mai *et al.* .2004).

El microbioma del tracto gastrointestinal humano juega, entonces, un papel clave en la nutrición y en la salud de las personas. En la actualidad, hay un aumento en el uso de componentes que ayudan a mantener, o incluso mejorar, el "equilibrio" de la microflora intestinal con la dieta de las personas.

Las *bifidobacterias* son el grupo predominante de la microflora colónica, pudiendo representar hasta el 25% del número total de bacterias presentes (Pedreschi *et al.* 2003). Son las más importantes del grupo promotor de la salud humana. *Bifidobacterium* sp. domina la microflora intestinal de bebés amamantados. Entre los efectos beneficiosos de *bifidobacterias* se conocen: Protección contra la infección entérica, disminución del pH intestinal por formación de ácidos después asimilación de carbohidratos (Wang *et al.* 2010), supresión de bacterias putrefactivas y patógenas, producción de vitaminas, activación de la función intestinal, asistencia de la digestión y absorción, y estimulación de la respuesta inmune (Van der Meulen *et al.* 2004; Kolida *et al.* 2002).

Estudios en humanos han demostrado que diferentes cepas de *bifidobacterias* inducen cambios en las respuestas inmunitarias favoreciendo un perfil antiinflamatorio que se asocia con la disminución de los síntomas abdominales de los pacientes con colon irritable (O'Mahony *et al.* 2005). Los efectos moduladores del microbioma intestinal no se limitan a efectos locales a nivel del tracto digestivo, sino que, diferentes estudios han demostrado que las bacterias intestinales actúan sobre el eje cerebro intestinal y el sistema nervioso central, lo que condiciona a las respuestas conductuales del individuo (Wallace *et al.* 2003; Simren *et al.* 2013).

### 3.3. Compuestos Prebióticos

Se ha definido prebiótico como un ingrediente alimenticio "no digerible" que afecta beneficiosamente al ser humano por estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon (Gibson y Roberfroid, 1995). En este contexto, un prebiótico es un ingrediente dietético que llega al intestino grueso en forma intacta y tiene un metabolismo específico en el mismo, que beneficia al hospedador. Esto finalmente llevaría a un marcado cambio en la composición de la microflora intestinal. Los organismos que metabolizan los prebióticos son especies pertenecientes a los generos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estos compuestos también pueden reducir o suprimir tanto el número como la actividad de organismos patógenos. Es decir, son aquellos compuestos que son fermentados selectivamente por probióticos (*bifidobacterias* y *lactobacilos*) que inducen cambios específicos en la composición y/o actividad del microbioma gastrointestinal, que confieren beneficios al bienestar del huésped y salud en general (Gibson *et al.* 2004; Gibson y Roberfroid, 1995). Los fructanos de tipo inulina generalmente fueron los primeros compuestos en responder al concepto prebiótico (Al-Sheraji *et al.* 2013). Los prebióticos pueden modular el microbioma intestinal, los microorganismos humanos asociados que evolucionan conjuntamente con el ser humano (Salvucci *et al.* 2016).

Para que un sustrato pueda clasificar como prebiótico, se deben cumplir los tres criterios siguientes:

- 1) el sustrato no debe hidrolizarse ni absorberse en el estómago o intestino delgado;
- 2) debe ser selectivo para bacterias comensales beneficiosas en el colon mediante el fomento del crecimiento y/o metabolismo de los organismos;
- 3) tener capacidad de alterar la microflora del intestino de manera saludable, y ejercer beneficios efectos luminales y/o sistémicos (Roberfroid *et al.* 2007; Kolida *et al.* 2002; Gison y Fuller, 2000).

El efecto prebiótico en el intestino se puede evaluar mediante la proliferación de *lactobacilos* y *bifidobacterias*, la disminución de patógenos intestinales, el aumento de la producción de metabolitos relacionados con la actividad de bacterias beneficiosas como ácidos grasos de cadena corta y la disminución de metabolitos tóxicos como poliaminas y amonio (Al-Sheraji *et al.* 2013). La modulación de bacterias beneficiosas puede dar como resultado un efecto regulador a niveles inmunológicos o

neuroendocrinos (Bercik *et al.* 2011b). El desarrollo de terapias prebióticas es un campo interesante para mejorar la disbiosis que aparece en varias enfermedades y para evaluar su impacto a nivel sistémico.

### **3.4. Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC)**

Los AGCC son ácidos orgánicos de 1 a 6 carbonos. Son los principales aniones que surgen de fermentación bacteriana de polisacáridos, oligosacáridos, precursores de proteínas, péptidos y glicoproteínas en el colon (Wong *et al.* 2006). La fermentación implica una variedad de reacciones y procesos metabólicos en donde los microorganismos anaerobios metabolizan la materia orgánica, produciendo energía para el crecimiento y mantenimiento de microorganismos y productos metabólicos finales que favorecen al huésped. En el contenido intestinal se encuentran principalmente los ácidos acético, propiónico y butírico (C:2, C:3 y C:4, respectivamente), que se forman debido a la fermentación de la fibra dietética, el contenido relativo y la cantidad total dependen de las especies que componen la microflora intestinal, el sustrato fermentable disponible y el tiempo de tránsito intestinal (Fiorini *et al.* 2016). Los AGCC generados son absorbidos en el colon y utilizados preferentemente como combustible por sus células epiteliales, generando efectos tróficos sobre el epitelio (Cook y Sellin, 1998).

La materia orgánica no digerible que fermenta el microbioma incluye al almidón resistente, otros polisacáridos y oligosacáridos no digeribles, así como algunas proteínas y aminoácidos (Topping y Clifton, 2001). Los principales productos son los AGCC lineales, principalmente acético (C:2), propiónico (C:3) y butírico (C:4) (Gibson, 1999; Cummings y Macfarlane, 1991). Sin embargo, otros productos de fermentación pueden ser el ácido láctico y succínico (Roberfroid *et al.* 1998).

La presencia tanto de carbohidratos no digerible como de AGCC pueden alterar la fisiología del colon drásticamente de manera positiva (Wong *et al.*, 2006). Diversos estudios sobre población microbiana han demostrado que la producción de AGCC está en el orden de C:2 > C:3 > C:4 en una relación molar de aproximadamente 60:20:20 principalmente en el colon proximal y distal (Topping y Clifton, 2001; Cummings *et al.* 1997). Un aumento en la síntesis de AGCC también crea un ambiente más ácido en el intestino, que es importante en términos de resistencia a la colonización de patógenos (Roberfroid, 2000; Gibson, 1999). La producción de AGCC se ve afectada por muchos factores, incluido la fuente de sustrato (Cook y Sellin, 1998), la composición química, la cantidad, las características físicas del sustrato fermentable (por ejemplo, tamaño de

partícula, solubilidad, asociación) (Macfarlane y Macfarlane, 2007), la composición de especies bacterianas del microbioma (Roberfroid, 2005), factores ecológicos (interacciones competitivas y cooperativas entre diferentes grupos de bacterias) y el tiempo de tránsito intestinal (Cummings y Roberfroid, 1997).

El intestino de los ratones comprende cuatro secciones: ciego, proximal, transversal (medial) y distal del colon. El ciego y colon proximal son los principales sitios donde se lleva a cabo la fermentación, dada la cantidad de bacterias y la disponibilidad de sustrato, porque a medida que se mueve a través del intestino hacia la parte distal del colon, hay una menor concentración de agua, así como un agotamiento de carbohidratos y aumento del pH (Tremaroli y Backhed, 2012; Bernalier *et al.* 1999). Los AGCC se absorben rápidamente en el ciego y el colon, excretándose en las heces sólo del 5% al 10% (Wong *et al.* 2006). Los principales AGCC (C:2, C:3 y C:4) son absorbidos a tasas comparables en diferentes regiones del colon. Una vez absorbidos, los AGCC son metabolizados en tres sitios principales: 1) células del epitelio ciego-cólico que usa ácido butírico como sustrato principal para la energía de mantenimiento; 2) células hepáticas que metabolizan residuos ácido butírico y propiónico utilizados para la gluconeogénesis y del 50% al 70% de ácido acético también es absorbidos por el hígado; y 3) células musculares que generan energía a partir de la oxidación del acético residual (Van Loo *et al.* 1995).

El ácido acético es el principal AGCC producido en el colon, y debido a que se absorbe fácilmente y se transporta al hígado, es el ácido que se metaboliza menos en el colon (Cook y Sellin, 1998). La presencia de acetil-CoA sintetasa en el citosol de las glándulas mamarias y adiposas permite el uso del acético para la lipogénesis una vez que ingresa a la circulación sistémica (Wong *et al.* 2006). El ácido acético es, también, el sustrato primario para síntesis de colesterol. En el huésped, puede ser absorbido y utilizado por los tejidos periféricos (Pomare *et al.* 1985).

Por otro lado, el ácido propiónico puede seguir dos vías principales: 1) mediante la fijación de CO<sub>2</sub> para formar succinato, que posteriormente se descarboxila (la "vía del ácido dicarboxílico") y 2) forma lactato y acrilato (la "vía de acrilato") (Cummings, 1981). El propiónico también es un sustrato para la gluconeogénesis en hígado y se ha informado que este ácido inhibe la síntesis de colesterol en tejido hepático (Venter *et al.* 1990; Cheng y Lai, 2000). La relación de propiónico y acético en el colon es relevante, ya que disminuye síntesis de colesterol procedente de la vía de acético.

Finalmente, el ácido butírico es el combustible preferido por las células epiteliales del colon, y juega también un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Topping y Clifton, 2001). Es el AGCC más importante el

metabolismo de estas células, donde el 70% a 90% del butírico es metabolizado por los colonocitos (Hamer *et al.* 2008; Koropatkin *et al.* 2012). Es utilizado preferentemente sobre ácido propiónico y acético en una proporción de 90:30:50 (Cook y Sellin, 1998). Aproximadamente el 95% del butírico producido por bacterias colónicas se transporta a través del epitelio, pero las concentraciones en la sangre portal es generalmente indetectable como resultado de una utilización rápida de este ácido (Pryde *et al.* 2002).

### **3.5. Microbioma y el eje intestino-cerebro**

Dado que en el sistema gastrointestinal se encuentra una parte fundamental del sistema inmunológico y que es también donde se concentra parte del sistema nervioso, no resulta sorprendente que exista una interacción compleja e intrincada entre microbioma-sistema inmune-sistema nervioso (Borre *et al.* 2014; Wang y Kasper; 2014; Douglas-Escobar *et al.* 2013; Cryan y Dinan; 2012; Heijtz *et al.* 2011). Se le llama eje microbioma-intestino-cerebro a una vía bidireccional de comunicación entre el sistema nervioso central y el intestino, en la cual participa activamente el metabolismo de los microorganismos (Foster *et al.* 2013; Bercik *et al.* 2012). Esta comunidad microbiana intestinal influye en la química cerebral y en el comportamiento, independientemente del Sistema Nervioso Autónomo, neurotransmisores gastrointestinales o inflamación (O'Mahony *et al.* 2015; Heijtz *et al.* 2011). Asimismo, participa decisivamente en el metabolismo de neurotransmisores como el GABA y serotonina, relacionados a ansiedad, depresión y estados de ánimo (Foster *et al.* 2013). Las enfermedades inflamatorias intestinales suelen acompañarse por disbiosis, y alteraciones nerviosas como irritabilidad, ansiedad, depresión (Overstreet *et al.* 2012; Rinttilä *et al.* 2011). Se ha observado que el microbioma es inestable y presenta menor diversidad en enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y síndrome de colon irritable. La depresión y la ansiedad son comunes en EII y se asocia con un curso de la enfermedad más intenso (Bercik *et al.* 2011a). Por otro lado, la disbiosis puede contribuir a desórdenes psiquiátricos en pacientes con síntomas intestinales (Collins *et al.* 2012, Bercik *et al.* 2011b). La modulación del microbioma pretende intervenir en la sintomatología o las causas de las enfermedades a fin de lograr una mejora en el estado de salud.

*Bifidobacterium longum* normaliza el comportamiento de ansiedad y los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro en hipocampo de ratones con colitis, mientras que *B. infantis* atenúa los cambios inmunológicos inducidos por estrés en niños y

comportamientos tipo depresivo en adultos (Savignac *et al.* 2014; Mayer *et al.* 2014). *Bacteroides fragilis* puede mejorar la impermeabilidad intestinal, alterar la composición microbiana y mejorar defectos en ansiedad, comunicación y comportamiento sensoriomotor, a la vez que modula los niveles de varios metabolitos incrementados en modelos de autismo (Hsiao *et al.* 2012).

Siendo estos tan sólo algunos de los numerosos ejemplos, actualmente se ha focalizado la atención en la capacidad moduladora y regulatoria de terapias probióticas y prebióticas sobre distintos aspectos de los trastornos del neurodesarrollo (Hsiao *et al.* 2004; Hsiao *et al.* 2012). En ese sentido, los arabinosilanos presentes en el grano de trigo, se convierten en un componente interesante para evaluar sus efectos sobre estos desórdenes.

### **3.6. La reconstitución del microbioma**

El trasfondo genético necesario para desarrollar algunas enfermedades (factores intrínsecos) está directa y estrechamente relacionado e influido por el metabolismo del microbioma (factores extrínsecos) (De Theije *et al.* 2014; Johnson y Versalovic, 2012). Distintas enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la diabetes tipo 1, artritis, lupus, la enfermedad inflamatoria intestinal y el asma pueden ser tratadas mediante la restauración del bioma, proceso que en parte pretende ser realizado mediante la administración de probióticos (Pärtty *et al.* 2015). El uso de probióticos, que intenta que se "reequibre" la flora comensal normal mediante la introducción deliberada de microorganismos beneficiosos, tiene varias observaciones clínicas y éxitos en modelos animales (Saad *et al.* 2013; Mikami *et al.* 2012). Pero además de su estrecha relación con la regulación inmunológica, el microbioma incide en el llamado eje intestino-cerebro (Mayer *et al.* 2014). La reconstitución del microbioma se ha estudiado y aplicado sobre todo en las enfermedades metabólicas (obesidad, síndrome metabólico) e inflamatorias (Síndrome de colon irritable, Enfermedad de Crohn, Enfermedad inflamatoria intestinal) o inmunológicas (alergias), pero es novedosa en las enfermedades relacionadas al sistema nervioso, como los trastornos de espectro autista o la esquizofrenia (Severance *et al.* 2014). El metabolismo de los microorganismos actúa no sólo a nivel local, sino que también genera múltiples cambios a nivel de neurotransmisores y hormonas, por lo que su metabolismo forma parte del metabolismo global del huésped (O'Mahon *et al.* 2015; Severance *et al.* 2014). Es decir, que el microbioma es considerado como un "nuevo

órgano” a considerar para incidir en la salud o enfermedad del superorganismo humano (Evans *et al.* 2013), por lo tanto la modulación de la composición microbiana intestinal podría ejercer modificaciones en algunos de los signos o síntomas de las distintas enfermedades.

### **3.7. Epigenética y microbioma intestinal**

La epigenética se refiere a las modificaciones del genoma que no alteran la secuencia de ADN pero causan cambios hereditarios mitóticos y meióticamente (Morgan *et al.* 2008). Existe una amplia variedad de mecanismos que reducen, activan o inactivan los genes y las redes reguladoras que influyen en la diferenciación celular temprana y crean nuevos rasgos fenotípicos durante el embarazo y durante el período neonatal (Indrio *et al.* 2017; Liu, 2007). Varios factores prenatales y postnatales, incluida la dieta y la composición del microbioma, contribuyen a los cambios epigenéticos que influyen en la salud y la enfermedad de por vida al modificar las vías moleculares inflamatorias y la respuesta inmune (Indrio *et al.* 2017).

El principal mecanismo epigenético es la metilación de residuos de citosina en el ADN, lo que da como resultado la remodelación de la estructura de la cromatina y la regulación mediada por ARN. Estas modificaciones pueden regular al alza o disminuir la expresión del gen de acuerdo con el tipo de cambio y su posición. Un grupo de enzimas cataliza la metilación del ADN. Consiste en la metilación de residuos de citosina seguida de guanina o adenina y la consiguiente supresión de la expresión génica (Abdolmaleky *et al.* 2015).

Otros mecanismos epigenéticos son la acetilación y la fosforilación. Los diferentes aminoácidos de las colas de las histonas pueden estar metilados, acetilados o fosforilados (Alam *et al.* ,2017). La acción de las acetiltransferasas da como resultado la acetilación de residuos de histonas que aumenta la accesibilidad del ADN nucleosomal a los factores de transcripción, aumentando así los niveles de expresión de los genes correspondientes (Alam *et al.* ,2017).

El microbioma tiene la capacidad de inducir cambios epigenéticos en el superorganismo humano-microbiota. Entre los mecanismos a través de los cuales las bacterias intestinales pueden influir en la salud humana, las modificaciones epigenéticas son las más importantes. El epigenoma influye en el establecimiento del microbioma, pero

también los microorganismos pueden introducir cambios epigenéticos en los genes relevantes para el desarrollo y las funciones inmunológicas, metabólicas y neurológicas. Por ejemplo, los AGCC que regulan la expresión génica mediante la metilación del ADN o las modificaciones de las histonas son de los principales metabolitos generados por las bacterias del microbioma intestinal (McKenzie *et al.* 2017; Indrio *et al.* 2017).

Las interacciones microbianas del huésped que caracterizan a los superorganismos humanos comienzan antes del período posnatal temprano. De hecho, el microbioma que se encuentra en el líquido amniótico comienza a modular el feto epigenéticamente desde su vida placentaria (Zheng *et al.* 2017; Urushiyama *et al.* 2017). Además, la dieta, la exposición a antibióticos y otros factores ambientales influyen en la composición del microbioma y sus cambios epigenéticos. Todos estos factores contribuyen al mayor o menor riesgo de desarrollar alergias y enfermedades inflamatorias (Cremonini *et al.* 2003; Schaub *et al.* 2009).

Es difícil establecer una relación causal entre la diversidad o prevalencia de ciertas especies en el microbioma y el epigenoma. Sin embargo, hay algunas pistas relacionadas con las proporciones de Firmicutes / *Bacteroides* y distintos perfiles de metilación del ADN. Las condiciones patológicas asociadas con trastornos metabólicos también tienen diferencias en la metilación en genes relacionados con la obesidad, el metabolismo y la inflamación (Kumar *et al.* 2014).

Los cambios epigenéticos como la metilación aberrante del ADN, las modificaciones de las histonas y la desregulación de los micro-ARN están relacionados con la patogénesis de los trastornos mentales (Abdolmaleky *et al.* 2015). Valproato, litio, lamotrigina, haloperidol, clozapina, olanzapina y risperidona alteran la expresión de muchos miRNAs (Abdolmaleky *et al.* 2015). El microbioma intestinal contribuye al ajuste epigenético confirmando su papel como un eslabón ontogénico perdido en enfermedades mentales. Esto implica que las modificaciones epigenéticas son una alternativa plausible para el tratamiento de los trastornos mentales y, en consecuencia, la modulación del microbioma intestinal puede ser un blanco para las terapias.

## 4. SÍNDROME DE RETT

El Síndrome de Rett (RTT, OMIM #312750) es una enfermedad de herencia dominante ligada al sexo, manifestada como un desorden severo del neurodesarrollo vinculado al cromosoma X, que afecta principalmente a niñas de todas las razas y grupos étnicos, teniendo una incidencia de 1 cada 10000 a 15000 nacimientos. Esta patología fue descrita por primera vez por el Dr. Andreas Rett en 1966, sin embargo, recién en 1983 se volvió ampliamente reconocida gracias a reportes en la literatura inglesa realizado por Bengt Hagberg y colegas, quienes atribuyeron el nombre de Rett a dicha condición (Leonard *et al.* 2017). RTT constituye una de las causas conocidas más frecuentes de retraso mental grave en el sexo femenino y de manera excepcional en el masculino (Campos-Castello *et al.* 2007).

### 4.1 Características clínicas

Las niñas con RTT clásico suelen tener un período relativamente normal de desarrollo durante los primeros 6 meses de vida seguido de retardo variable (incluso estancamiento), y luego una regresión que se caracteriza por una pérdida gradual o repentina de las habilidades adquiridas durante el desarrollo después del primer año de vida, que conduce a la aparición de déficits cognitivos y motores profundos (Leonard *et al.* 2017).

El período de regresión particularmente involucra la pérdida de habilidades lingüísticas expresivas y del movimiento intencionado de las manos (uno de los elementos más característicos de la enfermedad), pero puede extenderse a las habilidades motoras y de socialización gruesas (Neul *et al.* 2014). Es típicamente durante este período regresivo cuando algunas niñas pueden cumplir los criterios de diagnóstico para el trastorno del espectro autista (TEA). A pesar del hecho de que RTT no ha sido clasificado como TEA en la última edición (5ta) del Manual de Diagnóstico y Estadística de Desórdenes Mentales (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), un individuo con RTT también puede recibir un diagnóstico de autismo si cumple con los criterios de comportamiento (Katz *et al.* 2016; Young *et al.* 2008).

La pérdida de habilidades en el tiempo es variable entre los casos de RTT, sin embargo, normalmente se estabiliza entre los 30-36 meses de vida (Neul *et al.* 2014). En una gran proporción de individuos puede haber una pérdida adicional de habilidades motoras en

la adolescencia tardía o edad adulta temprana, cuando las características parkinsonianas se hacen prominentes (Humphreys y Barrowman, 2016).

Entre otras de las características distintivas de RTT se destaca un descenso paulatino en el crecimiento del perímetro craneal, lo que conduce a microcefalia en el 80% de los pacientes con RTT. Esta característica puede aparecer precozmente en los tres primeros meses de vida, aunque frecuentemente se observa entre los 6 y 24 meses de edad (Campos-Castello *et al.* 2007; Kaufmann *et al.* 2016).

Durante el período de post-regresión, entre el primer y tercer año de vida, en la mayoría de las niñas con RTT aparece el signo de identidad de este síndrome: los movimientos estereotipados de las manos, característicamente de lavado, torcedura (manos juntas), pero también de palmoteo o de aplausos (manos separadas). Las niñas con RTT pueden recuperar parcialmente algunas de las habilidades perdidas durante el período de regresión; aun así, la pérdida significativa de habilidades verbales y del uso intencionado de las manos sigue siendo un sello distintivo del trastorno (Campos-Castello *et al.* 2007). Pueden aparecer otras estereotipias y “pseudocrisis” (temblores, caídas bruscas, detención del movimiento, episodios de risa o gritos inmotivados). La marcha suele ser normal al inicio, pero se va volviendo apráxica, amplia, errática y no propositiva (Campos-Castello *et al.* 2007). Aproximadamente un tercio de los pacientes deja de caminar, alrededor del 50% mantienen la marcha independiente y otro 20% camina con algún nivel de asistencia (Pozzo-Miller *et al.* 2015).

Convulsiones que evolucionan hacia la epilepsia se desarrollan en el 60-80% de los pacientes con RTT, típicamente entre el final del período de regresión y el comienzo del período de post-regresión. A pesar del gran impacto que significan las convulsiones en la calidad de vida de los pacientes con RTT, aún hoy es relativamente poco lo que se conoce sobre la eficiencia de drogas antiepilépticas (Kaufmann *et al.* 2016).

Alteraciones respiratorias, cardíacas, nutricionales y un retraso general del crecimiento también están presentes y requieren un estrecho seguimiento y fuerte apoyo a lo largo de toda la vida de las pacientes ya que se asocian con las causas de mortalidad más comunes en las pacientes de RTT que alcanzan la edad adulta (Tarquinio *et al.* 2015).

Estimaciones recientes a cerca de la longevidad de las pacientes con RTT clásico indican que la supervivencia hasta la edad de 25 años es del 77,6% y hasta los 37 años del 59,8% (Ehrhart *et al.* 2016).

## **4.2. Etiología**

La causa principal de RTT en aproximadamente el 90% de los pacientes son mutaciones en el gen MECP2, situado en la región distal del cromosoma X (Xq28). Dicho gen codifica para una proteína llamada MeCP2 (proteína de unión a metil-citosina-guanosina 2 o methyl-CpG-binding protein 2) la cual se une al ADN y tiene la función principal de regular la expresión génica (Amir *et al.* 1999; Ehrhart *et al.* 2016).

Hasta el momento, se han identificado más de 250 mutaciones diferentes en MeCP2 en individuos con RTT. Sin embargo, 8 mutaciones puntuales comunes (R106W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X, R306C) representan aproximadamente el 65% de las mutaciones presentes en estos pacientes, mientras que las deleciones grandes que implican uno o más exones y supresiones 3' representan otro 15 -18% de los individuos RTT (Calfa *et al.* 2011).

Cabe aclarar que no siempre existe una clara correlación entre mutaciones específicas en MECP2 y trastornos individuales o gravedad fenotípica, lo que sugiere que factores genéticos, epigenéticos y/o ambientales interactúan con la mutación en MECP2 para determinar el resultado fenotípico final en términos de tipo y gravedad del trastorno (Gonzales y LaSalle, 2010).

En la mayoría de los casos registrados, las mutaciones son espontáneas o “*de novo*”, por lo que RTT se presenta de forma esporádica en el 99% de los casos, y el riesgo de la pareja de tener otra hija afectada es inferior al 1% (Pozzo-Miller *et al.* 2015).

## **4.3. Modelos animales**

Es difícil comprender cómo la disfunción de esta proteína, que participa en la regulación transcripcional de cientos de genes (regulador transcripcional global), conduce a síntomas neurológicos bien definidos. Para investigar esta pregunta y entender los mecanismos patogénicos de la enfermedad, los modelos animales han sido de gran utilidad. Se han utilizado estrategias de “*gene targeting*” para generar varias líneas de ratones portadores de mutaciones en MeCP2. Estos ratones mutantes se consideran buenos modelos de RTT por su elevada validez de constructo, es decir, la medida en que un modelo reproduce la etiología y fisiopatología de un trastorno. Además, la caracterización conductual de los ratones mutantes para MeCP2 recapitulan muchos de los síntomas de RTT (Ricceri *et al.* 2007).

En el presente trabajo utilizamos ratones del modelo MeCP2-308. Estos portan una mutación que genera una proteína truncada y recapitulan de forma similar muchas características de RTT (Shahbazian *et al.* 2002), presentan un peso corporal dentro del rango normal y son fértiles. Los ratones machos mutantes (hemicigotas MeCP2308/y) no muestran anomalías aparentes hasta alrededor de las 6 semanas de edad, cuando los temblores son detectables al suspender a los animales por la cola, mientras que los mismos se vuelven evidentes a simple vista a los 4 meses de edad. Después de los 5 meses de edad, el 40% de los animales desarrolla cifosis y ya los 8 meses de edad, la piel de los ratones mutantes es notablemente más grasa y descuidada que la de los wt. Se observan también espasmos mioclónicos espontáneos, convulsiones, ataxia y anomalías respiratorias en varios ratones mutantes (Moretti *et al.* 2005). La mayoría de los ratones machos MeCP2308/y sobreviven durante al menos 1 año de edad, mientras que las hembras heterocigotas muestran signos más leves y variables a partir del primer año de vida.

## **5. CANCER DE COLON**

En Argentina el cáncer colon-rectal es el segundo más frecuente, después del cáncer de mama, con una incidencia de un promedio de 13558 casos por año, siendo casi la misma cantidad de casos encontrados en hombres y en mujeres según la IARC en el 2012 (Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud de la República Argentina). Si la enfermedad se detecta temprano se puede realizar la resección quirúrgica, pero muchos pacientes todavía necesitan quimioterapia o radioterapia complementarias. En la mayoría de los casos, las quimioterapias de uso común están limitadas por los efectos secundarios graves, la limitación de la dosis de toxicidad y los efectos adversos relacionados con el fármaco que empeoran la calidad de vida de los pacientes (Schnell, 2003). En las últimas dos décadas, se han investigado productos naturales con actividad anticancerígena efectiva. El uso de medicamentos a base de hierbas también está aumentando en pacientes con cáncer (Garodia *et al.* 2007, Lee *et al.* 2006).

Las alteraciones genéticas que promueven la proliferación y supervivencia de células tumorales al inducir alteraciones fisiológicas dentro de las células tumorales son desregulación de la apoptosis, del ciclo celular y de las vías de señalización del factor de crecimiento (Shanahan y Weinberg, 2000). El resultante es un aumento patológico en el número de células que se define como tumor. Por el contrario, el cáncer se define

por la capacidad de penetrar en la membrana basal y estroma subyacente e invadir el tejido de su entorno (Liotta *et al.* 2000). Propiedades importantes de las células cancerosas invasivas incluyen la disminución de la adhesión célula-célula, remodelación citoesquelética, aumento de motilidad, aumento de la producción de proteasas, entre otros (Krishnamachary *et al.* 2003). La progresión del tumor y la mortalidad del paciente se correlaciona con la densidad microvascular (Folkman, 2000; Kerbel, 2000) e hipoxia intratumoral (Hockel y Vaupe, 2001).

La carcinogénesis es un proceso multietápico que consiste en fases de iniciación, promoción y progresión que involucran generaciones secuenciales de células que exhiben perturbación continua de las cascadas de señal celular y molecular (Vincent y Gatenby, 2008). Por lo tanto, la secuencia de eventos de varias etapas tiene muchas fases para inhibir, revertir y/o retrasar cada proceso de carcinogénesis antes del desarrollo de malignidad invasiva. En años recientes, productos naturales han recibido una gran atención por su capacidad de prevención del cáncer (Rajamanickam *et al.* 2008), y el consumo a largo plazo de ciertos ingredientes naturales podría estar asociado con una reducción en la incidencia de cáncer.

Diferentes estudios han sugerido que las fibras dietéticas actúan como protectoras contra el desarrollo de cáncer colorrectal (Samuelsen *et al.* 2011). Los AGCC producidos por la fermentación de estos carbohidratos estimulan el crecimiento de las células de la mucosa colorrectal, retardan la atrofia y disminuyen el riesgo de transformaciones malignas en el colon siendo el butirato particularmente efectivo en disminuir el riesgo de malignidad (Forest *et al.* 2003, Mentschel y Claus, 2003). Es sabido que el grado de fermentación y el perfil de AGCC depende del sustrato (Karppinen *et al.* 2000; Salvador *et al.* 1993) y que la velocidad de fermentación del polisacárido puede ser crítico para su acción en el colon. La fermentación más lenta produce AGCC en el colon distal, y esto puede tener un efecto protector contra la carcinogénesis de colon (Karppinen *et al.* 2000; Edwards *et al.* 1995).

Los AXs tiene el potencial para producir efectos benéficos en humanos. Estas moléculas presentan un alto grado de diversidad estructural, mucho mayor que otros oligosacáridos comerciales, lo que dificulta establecer relaciones estructura-efecto. Los estudios que se han realizado hasta el momento son insuficientes, y queda pendiente aún establecer la relación entre la estructura de estos prebióticos, la producción de ácidos grasos de cadena corta y su efecto modulador del microbioma y la salud del individuo. Debido a la falta de información sobre la estructura y composición de los arabinoxilanos solubles de las harinas de grano entero de trigo y sobre las diferencias que podrían presentar estos compuestos en los trigos duros y blandos se plantea un análisis global de las harinas de grano entero de cada tipo de trigo, así como de extractos de los arabinoxilanos extraídos a partir de cada tipo de trigo.

La modulación que los AXs pueden ejercer sobre el microbioma puede afectar no sólo el aspecto nutricional, sino que también se relaciona a desórdenes del sistema nervioso central como se mencionó anteriormente. La capacidad de ciertas *bifidobacterias* de intervenir en el llamado eje intestino-cerebro a través de la regulación de ciertos neurotransmisores, abre la posibilidad de evaluar el efecto de los AX en modelos de desórdenes de espectro autista, como el síndrome de Rett, y valorar alternativas terapéuticas. Para esto es necesario conocer si estos modelos muestran perfiles de microbioma intestinal disbióticos, y confirmar el potencial efecto prebiótico de los AXs de las harinas de grano entero en un microbioma sano, para luego pensar en esta alternativa, incluso en la dieta diaria. Por esto también es necesario explorar otros de los posibles beneficios, además del efecto prebiótico, que pueden ejercer los arabinoxilanos de trigo en el intestino, como, por ejemplo, protección a la formación de carcinomas de cáncer de colon.

## OBJETIVO GENERAL

Se propone estudiar el contenido y composición de la fibra dietética de las harinas integrales obtenidas a partir de cultivares de trigo pan y líneas experimentales de trigo blando poniendo especial énfasis en el análisis de los arabinoxilanos y su efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudiar la composición fisicoquímica de las harinas integrales provenientes de las líneas de trigo blando y cultivares de trigo pan seleccionados.
- 2- Determinar la variabilidad en el contenido y composición de los AX en las harinas integrales de trigos pan y blandos.
- 3- Evaluar el efecto prebiótico *in vitro* de los extractos de arabinoxilanos solubles.
- 4- Evaluar el efecto prebiótico *in vivo* de los extractos de arabinoxilanos solubles en modelo murino.
- 5- Analizar las diferencias entre la composición del microbioma intestinal en un modelo murino con Síndrome de Rett y wild type.
- 6- Estudiar el efecto de los AX en el metabolismo de líneas celulares de cáncer.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## **1. MATERIAL VEGETAL**

Para el desarrollo de este proyecto se propone trabajar con 9 cultivares de trigo pan: CRONOX, KLEIN YARARA, KLEIN GUERRERO, ANIVERSARIO 75, BIOTINA 3004, BAGUETTE 11, ACA 315, ACA 320, LE 2330 y 12 líneas de trigo blando PM 647, 650, 663, 673, 679, 681, 682, 686, 687, 690, 691 Y 692 (INTA Marcos Juárez).

Los cultivares de trigo pan seleccionados corresponden a las variedades de mayor superficie cultivada en nuestro país en las últimas 3 campañas (2011, 2012 y 2013). Las líneas experimentales de trigo blando se seleccionaron por calidad galletitera (Moiraghi *et al.* 2011). Se acondicionaron los granos a un porcentaje de humedad del 15% y se molieron en un molino de rodillos al cual se le eliminaron los tamices. Las harinas integrales se almacenaron a -20 °C para evitar la degradación lipídica.

## **2. TAMAÑO DE PARTICULA DE LAS HARINAS**

La distribución de tamaño de partículas de las harinas se determinó con un analizador de tamaño de partícula láser (LA-960, Horiba Instruments, EE.UU.) usando el muestreador para líquidos. Se midió el diámetro de las partículas de harina basado en la distribución de volumen, tomando el volumen de partícula medio calculado usando la teoría de Fraunhofer. Se informaron los valores en  $\mu\text{m}$  de media,  $d_v 10$ ,  $d_v 50$ ,  $d_v 90$  (el  $d_v 10$  es el valor de tamaño de partícula donde el 10% de la distribución tiene un tamaño igual o menor a este; el  $d_v 50$  es el valor de tamaño de partícula donde el 50% de la distribución tiene un tamaño igual o es menor al mismo, y el  $d_v 90$  es el valor donde el 90% de la distribución tiene ese tamaño o es menor a este) y span ( $\text{Span} = [d_v 90 - d_v 10]/d_v 50$ ) de las muestras (HORIBA LA960 for windows [Wet] Ver2.20). Este último (span), proporciona el rango de separación entre el 10 por ciento y el 90 por ciento de los puntos, normalizados con el punto medio.

## **3. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS HARINAS**

### **3.1. Humedad**

El contenido de humedad se determinó por diferencia de pesada en 2 g de harina exactamente medidos antes y después de calentar en estufa a 135 °C a presión

atmosférica normal, durante 2 h. Los resultados se expresaron como porcentaje de agua perdida (Método 44-19, AACC Internacional 2000).

### **3.2. Cenizas**

La materia orgánica se incineró en mufla a 600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza. Los resultados se expresan como % en base seca (AACCI Method 08-01.01, AACC Internacional 11 th Edition).

### **3.3. Proteínas**

Se realizó el método AACCI 46-11.02 de la AACC Internacional 11 th Edition. El método es una variación del método de Kjeldhal donde se determina de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en la muestra. Se realizó una digestión de la muestra en ácido sulfúrico con sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición y un catalizador para acelerar la reacción (sulfato de cobre). El amoníaco liberado luego se destiló y valoró por retroceso con ácido bórico titulando con NaOH. Los resultados se expresan como % en base seca.

### **3.4. Materia grasa**

La cuantificación se realizó liberando la materia grasa de la muestra por medio de una hidrólisis ácida y posteriormente se extrae con éter etílico y éter de petróleo. Se pesaron 2 g de harina integral en tubos Mojonier y se le agregaron 10 mL de la solución de ácido clorhídrico (25+11) colocándolo en un baño a 70-80°C por 30 min. Una vez a temperatura ambiente se le agregaron 10 mL de etanol 96% v/v, y se realizó la extracción con Éter sulfúrico y Éter de Petróleo, recolectando el extracto en un balón previamente tarado. Este paso se repitió tres veces. Luego se evaporaron los solventes y se colocó en estufa a 103°C hasta que el peso del balón llegó a peso constante (Método 02-01A, AACC Internacional 2000). Los resultados se expresan como % en base seca.

### 3.5. Fibra Dietaria soluble e insoluble

Se utilizó el kit de Megazyme basado en el método 32-07.01 de la AACC (2000). Se sometió 1 g de muestra a un proceso de digestión enzimático con  $\alpha$ -Amilasa, Proteasa y Amilogucosidasa a diferentes temperaturas. Se filtró la fibra dietaria insoluble (IDF), lavando luego el residuo con agua destilada, etanol 95% y acetona y se colocaron los crisoles en la estufa a 130°C. La solución de filtrado, junto con el agua destilada con la que se lavó, se precipitó con 4 volúmenes de etanol 95% y se aplicó el mismo proceso de filtrado y lavado obteniendo la fibra dietaria soluble (SDF). Luego de secar ambos filtrados, se les determinó cenizas y proteínas, lo cual se resta al residuo total obtenido para conocer el valor de fibra. Los resultados se expresan como % en base seca.

$$FD = \frac{\left(\frac{R1 + R2}{2}\right) - A - P - B}{\frac{M1 + M2}{2}} \times 100$$

Donde:

- M1: peso de muestra 1
- M2: peso del duplicado
- R1: peso residuo M1
- R2: peso residuo M2
- A: cenizas
- P: proteínas
- B: blanco  $B = \left(\frac{BR1 - BR2}{2}\right) - BP - BA$

### 3.6. Arabinosilanos solubles y totales

La cuantificación de pentosanos totales y pentosanos solubles se determinó siguiendo el método del Orcinol-HCl con las modificaciones realizadas por Hashimoto *et al.* (1987). Las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron como % en base seca.

- Arabinosilanos totales (AXt): Se pesaron 10 mg de harina en tubos de hidrólisis de 15 mL a los cuales se adicionaron 2 mL de HCl 2 N. Se colocaron los tubos en baño de agua a 100 °C por un lapso de 2,5 h. Pasado este tiempo se dejaron enfriar y se neutralizaron con 2 mL de una solución de carbonato de sodio 2 N. Se agregaron 2 mL de una suspensión de levadura y se dejó fermentar durante 2 h a 30 °C para eliminar los azúcares fermentables. Luego de este período se

centrifugó a 1000 x g por 10 min. A 2 mL del sobrenadante se le aplicó el método del Orcinol-HCl, que consiste en agregar 0,1 mL de solución de orcinol al 1% en HCl concentrado. Los tubos se colocaron en baño de agua a 100 °C durante 30 min y posteriormente se leyó su absorbancia a 670 nm. Se realizó una curva de calibración empleando soluciones estándar de xilosa (C<sub>5</sub>O<sub>5</sub>H<sub>10</sub>) en agua de 80, 120, 160 y 200 µg / 3 mL, a las cuales se les aplicó también el método del Orcinol-HCl.

- Arabinoxilanos solubles en agua (AXs): A las muestras de 100 mg de harina se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se colocaron en baño de agua a 30 °C por 2 h con agitación cada 30 min. Luego se centrifugaron a 1000 x g por 15 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se sometió a hidrólisis con 1 mL de HCl 4 N durante 2 h a 100 °C. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar y se tomó una alícuota de 1 mL a la cual se le aplicó el método del Orcinol-HCl. Se realizó además una curva estándar con soluciones de xilosa (C<sub>5</sub>O<sub>5</sub>H<sub>10</sub>) en agua de 20, 40, 60, 80 y 120 µg/3 mL y se leyó su absorbancia a 670 nm.

## 4. EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE AX

### 4.1. Separación de AX solubles

Los AX solubles en agua se extrajeron siguiendo la metodología de Buksa *et al.* (2010). Las harinas integrales de trigo se trataron térmicamente para inactivar las enzimas del grano (130 °C, 90 min) y los AX se extrajeron con agua (1:20) a 50°C por 24 h con agitación. Las suspensiones se centrifugaron (Thermo Fisher Scientific, Sorval ST40R) a 1250 x g por 10 min. Los sobrenadantes se incubaron con α amilasa termo resistente (Sigma, 350 kU) durante 1 h a 85 °C. Posteriormente la solución se calentó a 95°C 30 min para inactivar enzimas y coagular proteínas, se trataron con celite y se filtraron. A los filtrados se los precipitó por el agregado de etanol/acetona (1:1) y se centrifugó a 1250 x g (10 min), se lavaron los precipitados con acetona y se secaron en estufa a 50°C 2 h. Los extractos obtenidos se almacenaron a – 20 °C.

## **4.2. Cuantificación y caracterización de AX**

### **4.2.1. Cromatografía gaseosa**

Se disolvieron 25 mg de los extractos de AXs en 0,5 mL de agua destilada y se hidrolizaron con 0,5 mL de ácido sulfúrico 4N durante 2 h a 100 ° C. Los extractos hidrolizados se llevaron a pH 7 con amoníaco y luego se liofilizaron (Rificord L-T8, Argentina). 10 mg de los extractos hidrolizados y liofilizados se disolvieron en 1 mL de piridina durante 35 min a 65 °C con (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) para derivatizar los monosacáridos y finalmente se centrifugaron para precipitar las impurezas. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso (CG). Se usó una columna capilar HP-5MS (Vaian 3800) (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de espesor de película) Agilent part N 190915-433, acoplada al detector de espectrometría de masas (Saturn 2000). Se realizó curva de calibración con estándares de SUPELCO (Monosaccharides Kit 47267) de Arabinosa, Xilosa, Galactosa, Manosa y Glucosa. Los resultados se obtuvieron por duplicado, se informó el valor promedio los cuales se expresaron como mg/g.

### **4.2.2. Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC)**

La técnica de cuantificación de los azúcares de los extractos se basa en la utilizada por Buksa *et al.* (2014). 25 mg de los extractos de hidrolizaron con 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) durante 3 h a 100 °C. El hidrolizado se centrifugó a 2000 x g durante 5 min, se tomó 1,6 mL del sobrenadante y se le agregó 3,4 mL de agua destilada. Se neutralizó con carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), y se filtró por una membrana de poro de 22 µm para su purificación e inyección en el HPLC (Shimadzu LC-20AT Prominence liquid chromatography, SCL-10 A sistema controller). Se realizó con columna de Supelco Ca (Sigma-Aldrich 59305-U Supelco, Alemania), a 80 °C (Shimadzu Column oven CT0-10AS VP), utilizando agua como fase móvil a un flujo de 0,5 mL/min y acoplado a un detector de índice de refracción (RID-10A Refractive Index detector). Los resultados se expresan como mg/g. Se realizaron curvas de calibración para arabinosa, xilosa y glucosa con estándares de SUPELCO (Monosaccharides Kit 47267) tratados de la misma manera que las muestras (figura 4).

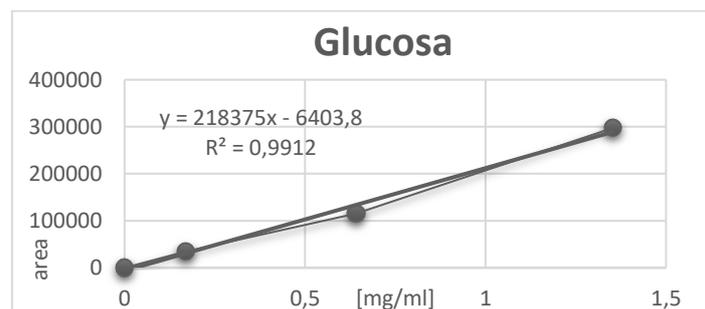
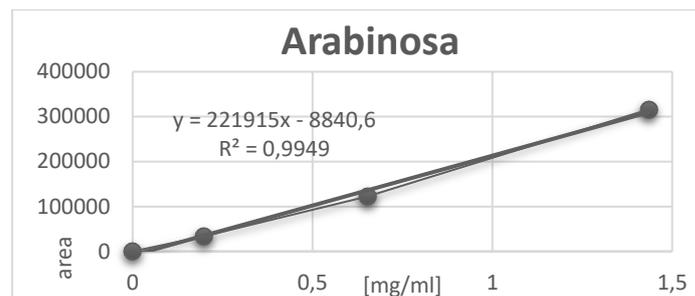
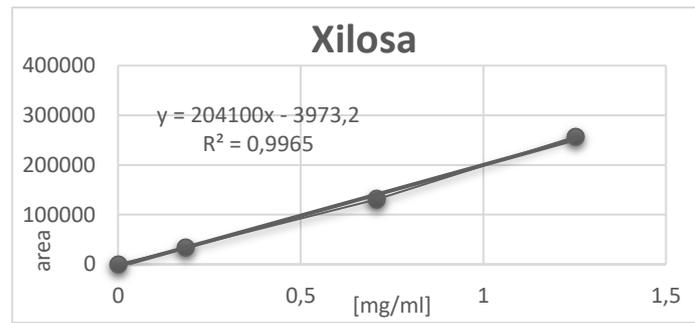


Figura 4. Curvas de calibración de los azúcares utilizados para caracterizar los AXs.

#### 4.2.3. Análisis de la distribución del tamaño molecular de los AXs

Se realizó mediante Cromatografía de exclusión de tamaño molecular de alta presión acoplada a un detector de índice de refracción (HPSEC-RID) usando el Sistema Infinity 1250 (Agilent, Santa Clara, CA). Las muestras se diluyeron 10 mg / mL de nitrato de sodio como fase móvil ( $\text{NaNO}_3$  0,2 M) y se inyectaron 25  $\mu\text{L}$ . La separación se realizó a través de cuatro columnas PL aquagel-OH MIXED-M (300 x 7,5 mm, 8  $\mu\text{m}$ ) en tándem (Agilent, Santa Clara, CA), a 35 °C con un flujo de 0,6 mL/min. Los pesos moleculares se estimaron usando series T dextran (5, 15, 35, 50, 80, 150 y 410 kDa; Fluka<sup>TM</sup>) como

estándares externos (Bernardino *et al.* 2017). La técnica brinda información robusta sobre el tamaño molecular de los compuestos en función del tiempo en el cual eluyen de la columna, pero la intensidad de las áreas es solo semicuantitativa.

#### 4.2.5. Determinación de $\beta$ -glucanos en los extractos de AXs

Se pesaron 100 mg de los extractos en tubos de 10 mL, y se colocó en 0,2 mL de una solución de etanol/agua (50:50) más 4 mL de fosfato de sodio 20 mM. Las muestras se homogeneizaron con vórtex y se colocaron durante 60 s en baño a 100 °C. Se homogeneizó nuevamente y se llevó 2 min más a 100 °C. Los tubos se quitaron del baño y se dejaron atemperar a 50 °C por 5 min. Se agregaron 10  $\mu$ L de Lichenase (specific, endo-(1-3) (1-4)- $\beta$ -D-glucan4-glucanohydrolase, Kit Mixed-linkage beta-glucan de Megazyme) y se incubó a 50 °C durante toda la noche. Se tomaron 100  $\mu$ L de las soluciones tratadas, se añadió 3 mL de reactivo de glucosa peroxidasa (GOPOD Reagent, Kit Mixed-linkage beta-glucan de Megazyme), y se incubó 20 min más a 50 °C. Una vez finalizada la reacción se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 510 nm de longitud de onda. Se realizó un blanco con agua destilada y una curva patrón de D-glucosa (D-glucose standard, Kit Mixed-linkage beta-glucan de Megazyme) en las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0  $\mu$ g/mL. Los resultados se expresaron como mg %.

## 5. EFECTO PREBIOTICO *IN VITRO*

### 5.1. Cepas y medios

Se cultivaron *Lactobacillus reuteri* ATCC23272, *Bifidobacterium breve*, *Bacteroides fragilis* 6292 y *Clostridium perfringens* 4168 en medio M.R.S; y *E. coli* ATCC25922 en caldo Brain Heart Infusion (BHI). Se realizaron controles de crecimiento en anaerobiosis o aerobiosis para cada una de las cepas, y se observó su morfología con coloración de gram en microscopio para confirmar la pureza de cada una de las cepas a trabajar. Para los ensayos de efectos prebióticos se realizó un medio semidefinido en base a Vernazza *et al.* (2005) y Zhang *et al.* (2013) con la siguiente formula: Peptona 1,5 g/L, extracto de levadura 2 g/L,  $K_2HPO_4$  0,04 g/L,  $KH_2PO_4$  0,04 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.04 g/L,  $NaHCO_3$  2 g/L, Tween 80 2 mL/L, sales biliares 0.5 g/L,  $CaCl_2$  0.01 g/L.

## 5.2. Efecto prebiótico in vitro

La prueba se llevó a cabo siguiendo el método de Huebner *et al.* (2007) con modificaciones. Se añadió un caldo semidefinido (Vernazza *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2013) con glucosa al 1% (p/v) o 1% (p/v) de los extractos AX (Rivière *et al.* 2014; Rubel *et al.* 2014). Se inoculó 1% (v/v) de un cultivo incubado a 37 °C 18 h de cada una de las cepas a analizar. Los cultivos se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas en el caso de *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides*, y en condiciones aeróbicas para *Lactobacillus* y *E. coli*. A las 0 y 24 h de incubación, se realizaron los recuentos de UFC/mL de cada uno de los inóculos en agar MRS en todos los casos excepto *E. coli* que se sembró en agar BHI. Se incubaron 24 h a 37 °C y se contaron el número de colonias crecidas por placa. Cada ensayo se realizó por duplicado y se incluyó inulina comercial como control positivo, y un tubo con el medio semidefinido sin el agregado de ningún hidrato de carbono como control negativo.

### 5.2.1. Crecimiento relativo (CR)

El CR se obtuvo por la relación entre la misma cepa incubada en el medio con glucosa y la suplementada con el AX.

$$CR = \frac{x_{AX24} - x_{AX0}}{x_{G24} - x_{G0}}$$

donde ( $x_{AX24} - x_{AX0}$ ) es la diferencia de UFC/mL de la cepa a analizar (x) a tiempo 0 y 24 h después de estar incubada en el medio con extracto, y ( $x_{G24} - x_{G0}$ ) la de diferencia de UFC/mL a tiempo 0 y 24 h después de estar incubada en medio con glucosa.

### 5.2.2. Actividad Prebiótica

La AP se determinó usando la ecuación en Huebner *et al.* 2007, que se basa en la relación entre el CR de la cepa probiótica y la cepa de referencia, en este caso *E. coli*.

$$PA = \left( \frac{x_{Ax24} - x_{Ax0}}{x_{G24} - x_{G0}} \right) / \left( \frac{E. coli_{AX24} - E. coli_{AX0}}{E. coli_{G24} - E. coli_{G0}} \right)$$

Si el AX tiene actividad prebiótica, aumentará el crecimiento de las bacterias probióticas, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en relación con el crecimiento en el mismo medio de cultivo, pero sólo suplementado con glucosa, y ese crecimiento a su vez debe ser mayor que la cepa de referencia, que no está fermentando el compuesto prebiótico.

### 5.2.3. Índice prebiótico (IP)

El IP se calculó de acuerdo con (Palframan *et al.* 2003) con la ecuación:

$$IP = \left( \frac{Lb}{total} \right) - \left( \frac{Bac}{total} \right) + \left( \frac{Bif}{total} \right) - \left( \frac{Cl}{total} \right)$$

Donde Lb son las UFC/mL de *Lactobacillus*, Bac las UFC/mL de Bacteroide, Bif las UFC/mL de *Bifidobacterium* y Cl las UFC/mL de *Clostridium* 24 h después de la incubación, y total hace referencia al número total de UFC/mL a las 24 h de todas las cepas.

Si *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son probióticos, muestran un aumento relativo mayor que la población bacteriana total, se obtiene un IP > 1; si el aumento relativo es menor que el aumento bacteriano total, se obtiene IP < 1.

## 6. FERMENTACION *IN VITRO*

La fermentación *in vitro* de las muestras de AXs fue evaluada utilizando el contenido fecal de tres individuos voluntarios mayores de 18 años, sin antecedentes de enfermedades gastrointestinales, y que no hicieron uso de antibióticos en los 3 meses previos a la recolección de la muestra. Esta etapa fue realizada mediante la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de São Paulo. Las heces fueron recogidas en recipientes estériles y colocados en el hielo hasta la entrega de la muestra. Después de la recepción, fueron acondicionadas en CO<sub>2</sub> para mantenimiento de anaerobiosis, se hizo un pool de las tres muestras y se acondicionó nuevamente en CO<sub>2</sub>. La fermentación fecal se realizó según

lo descrito por Williams y Hord, (2005) y Jonathan *et al.* (2012). El medio de fermentación fue compuesto de solución basal (76%), solución de vitamina/fosfato (1%), solución reductora (4%) y solución bicarbonato (1%) (Tabla 2). Inmediatamente después de hacer el pool, las heces fueron diluidas seis veces (p/v) en NaCl 0,9% estéril y fueron homogeneizadas y filtradas en Miracloth (EMD Millipore). Se utilizaron para el tratamiento 100 mg de AXs, y se utilizó inulina como control positivo en igual cantidad. También se realizó un blanco de fermentación sin agregado de fibra.

Los frascos con 0,750 mL del inóculo se colocaron en baño con agitación a 37 °C, y se extrajeron muestras a las 0, 6, 12, 24 y 28 h. Para los diferentes tiempos de fermentación se evaluó la presión mediante un barómetro, el pH y se recogieron alícuotas para la determinación de AGCC y el análisis de la variación del tamaño molecular. A las 28 h se centrifugó todo el fermentado y se realizó extracción de ADN de barro fecal obtenido para la cuantificación de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* mediante qPCR.

Tabla 2. Composición del medio de fermentación hecho de acuerdo con Williams y Hord, (2005).

Soluciones del medio de fermentación	Componentes	Cantidades	Observaciones
<b>Solución basal</b>		*	
<i>Solución principal</i>		<b>1 L (completar con H<sub>2</sub>O)</b>	
	KCl	0,60 g	Autoclavado
	NaCl	0,60 g	Autoclavado
	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,20 g	Autoclavado
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,50 g	Autoclavado
	Piper buffer	1,50 g	Autoclavado
	NH <sub>4</sub> Cl	0,54 g	Autoclavado
	Trypticase	1,00 g	Autoclavado
	Resazurim (10%)	1,00 mL	Filtrado 0,22µm
<i>Solución mineral</i>		<b>10 mL</b>	
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00125 g	Autoclavado
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 g	Autoclavado
	ZnCl <sub>2</sub>	0,00125 g	Autoclavado
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00125 g	Autoclavado
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0025 g	Autoclavado
	SeO <sub>2</sub>	0,0025 g	Autoclavado
	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0125 g	Autoclavado
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0125 g	Autoclavado
	NaVO <sub>3</sub>	0,00157 g	Autoclavado
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0125 g	Autoclavado
	HCl 0,5M	Completar volumen 50 mL	

<i>Haemin</i>		<b>10 mL</b>	Filtrado 0,22µm
	Haemin	0,005 g	Burbujear CO <sub>2</sub>
	H <sub>2</sub> O	Completar volumen 50 mL	Autoclavado
<i>Solución ácidos grasos</i>		<b>10 mL</b>	Filtrado 0,22µm
	Ácido acético	0,3425 mL	
	Ácido propiónico	0,1500 mL	
	Ácido butírico	0,0920 mL	
	Ácido iso-butírico	0,0235 mL	
	Ácido 2-metil-butírico	0,0275 mL	
	Ácido valérico	0,0275 mL	
	Ácido iso-valérico	0,0275 mL	

*Continua*

<b>Partes del medio de fermentación</b>	<b>Componentes</b>	<b>Cantidades</b>	<b>Observaciones</b>
	NaOH 0,2M	Completar volumen 50 mL	
<b>Solución vitamina/fosfato</b>		<b>* 10x</b>	Filtrado 0,22µm
	Biotina	0,0102 g	
	Ácido fólico	0,01025	
	Calcio D-pantotenato	0,082 g	
	Nicotinamida	0,082 g	
	Riboflavina	0,082	
	Tiamina HCl	0,082	
	Piridoxina HCl	0,082	
	Ácido para-aminobenzóico	0,0102	
	Cianocobalamina	0,01025	
	Solución KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Completar volumen 50 mL	
<i>Solución KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,735 g	
	H <sub>2</sub> O	Completar volumen 50 mL	Autoclavado
<b>Solución reductora</b>		*	Burbujear N <sub>2</sub>
	Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O	1,025 g	
	Cisteína HCl	1,025 g	
	H <sub>2</sub> O	Completar volumen 50 mL	Autoclavado
<b>Solución bicarbonato</b>		*	Burbujear CO <sub>2</sub>
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,1 g	
	H <sub>2</sub> O	Completar volumen 50 mL	Autoclavado

\*Proporciones para preparar el medio de fermentación: solución basal (76%), solución de vitamina/fosfato (1%), solución reductora (4%) y solución bicarbonato (1%).

### **6.1. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de la fermentación *in vitro***

La cuantificación se realizó mediante cromatografía gaseosa (CG Agilent Technologies 7890B GC System, USA) con detector ionizador en llama (FID) y columna CP 7747 de sílice fundida (WCTO, Varian. Palo Alto, CA, USA). La temperatura del inyector fue 250 °C a presión constante de 2,8 KPa. La temperatura inicial de la corrida fueron 110 °C durante 2 min seguido de un aumento de 2 °C/min hasta los 140 °C y 40 °C/min hasta la temperatura final de 200 °C. El tiempo de corrida fue de 30 min, y se inyectaron 3 µL de muestra con split 1:10. Se colocaron 60 µL de fermentado con 40 µL de acetonitrilo y 10 µL de ácido 2-metil-valérico 0,5 % como patrón interno (Menezes *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2006), se centrifugaron y filtraron con 0,22 µm. Se realizó una curva de calibración con el mix de estándar de AGCC (Volatile Free Acid Mix, COD: CRM46975, Supelco, Bellefonte, PA, USA) en concentraciones de 2 mM a 8 mM. La curva también fue centrifugada y filtrada como las muestras. Los resultados se expresaron en mM.

### **6.2. Análisis de la variación de la distribución del peso molecular de los AXs durante la fermentación**

Se realizó mediante Cromatografía de exclusión de tamaño molecular de alta presión acoplada a un detector de índice de refracción (HPSEC-RID) en las mismas condiciones que para el análisis de los extractos (inciso 4.2.3).

## **7. ANÁLISIS DEL PERFIL DEL MICROBIOMA INTESTINAL**

### **7.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las muestras de materia fecal, contenido cecal (toma de muestras detallada en los incisos 7 y 8 de este capítulo) y cultivos de bacterias puras se realizó utilizando el kit comercial Stool DNA Extraction Kit AccuPrep (Bioneer K-3036) con modificaciones. La muestra se incubó primero durante 1 h a 37 °C en baño seco (AccuBlock Digital Dry Bath, Labenet International, Inc.) con solución amortiguadora con lisozima al 10% agitando cada 15 min, luego se procedió a agregar el 400 µL solución

amortiguadora de lisis del kit y 40  $\mu\text{L}$  de proteasa y se continuó con las instrucciones del mismo. Se incubó 15 min a 60 °C. Se centrifugó (centrifuga Spectrafuge 24D, Labnet International, Inc.) durante 5 min a 8500 x g, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se le agregaron 400  $\mu\text{L}$  del Bindig buffer, y se volvió a incubar a 60 °C durante 10 min. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se agito en vórtex durante 5 s. Se transfirió el contenido a un nuevo tubo que contiene la columna de retención y se centrifugó una vez más 1 min a 6000 x g. Se procedió al lavado con los buffers de lavado (solución de lavado 1 y solución de lavado 2), y por último se cambió de tubo a la columna de retención y se extrajo el ADN con el eluyente (10 mM Tris-HCl) centrifugando por 1 min a 4000 x g.

## **7.2. Cuantificación de ADN**

La concentración de ADN que contenían las muestras de material fecal o contenido cecal de los distintos ensayos, al igual que aquellas obtenidas a partir de cultivos bacterianos puros y de los amplificados obtenidos para la realización de la curva de calibración de la qPCR se cuantificaron a través de espectrofotometría utilizando el equipamiento y software Gen5, Take 3 (BioTec SRL, Argentina). Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, y calcula tanto la concentración de ADN de doble cadena en la muestra, como la relación  $A_{260}/A_{280}$ . La concentración de ADN se calculó con la siguiente formula:

$$\left[ DNA \frac{ng}{\mu L} \right] = Abs\ 260 \times 50 \frac{ng}{\mu L} / OD$$

Donde:  $50 \frac{ng}{\mu L}$  es el coeficiente de corrección para ADN de doble cadena.

## **7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para el control de la pureza de los genes amplificados con cada oligonucleico, y para obtener el producto limpio de amplificación para realizar la curva de calibración con la qPCR se realizó, primero, una PCR común (Biorad, USA) a las distintas temperaturas

de *melting* definidas para cada caso (indicados en la Tabla 3). El volumen final de la reacción fue de 25  $\mu$ L: 2  $\mu$ L de ADN, 2,5  $\mu$ L de Buffer de reacción (Mg Free Buffer 10X), 2,5  $\mu$ L de Cloruro de Magnesio 25 mM, 0,25  $\mu$ L de GoTaq ADN polimerasa (5U/ $\mu$ l, gtb oligos), 0,25  $\mu$ L de cada primer según secuencia a amplificar (los mismos utilizados para la qPCR), 2  $\mu$ L de dNTP 2,5 mM y 17,25  $\mu$ L de agua libre de DNAsas. Se realizaron un primer paso de 3 min a 94,0 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94,0 °C, 30 s a la temperatura de Melting del primer a utilizar y 1 min a 72,0 °C, un ciclo de 2 min a 72 °C y finalmente enfriar a 12,0 °C.

Los productos de la PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. La preparación de cada gel de agarosa se realizó pesando 1 g de agarosa para preparar 50 mL de gel, disolviendo la misma en 50 mL de solución tampón TAE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), esta mezcla se fundió en microondas hasta lograr una completa disolución de la agarosa, evitando la ebullición de la mezcla. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se le agregó 2,5  $\mu$ L de bromuro de etidio a partir de una solución stock de 10 mg/mL. Posteriormente se vació la mezcla en el molde de acrílico de la cámara electroforética (Bio Rad, California, USA) y se colocó el respectivo peine (de acuerdo a la cantidad de muestras a sembrar) para formar los pocillos en el gel a polimerizar.

La separación por tamaño molecular de los fragmentos de ADN se realizó sometiendo el gel y las muestras de ADN (mezcladas con 2  $\mu$ L de *loading buffer*) a una migración electroforética de corriente a voltaje constante (100 mV) con el mismo tampón TAE 1X de preparación del gel. El tamaño de los fragmentos separados se estimó comparando las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder), los cuales se cargaron en el gel junto a las muestras y controles. Se identificaron los fragmentos de ADN luego de la electroforesis, visualizándolos por emisión de luz UV resultante de la incorporación del bromuro de etidio a la doble hebra de ADN. Todos los resultados obtenidos a partir de electroforesis en geles de agarosa fueron registrados utilizando el transluminador UV (Ultraviolet Transilluminator BioImaging Systems) acoplado a un sistema de documentación fotográfica (Gel Doc-it, Imaging System).

#### 7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

El análisis del perfil de la composición del microbioma intestinal, en todos los casos que fue evaluado, se determinó a través de qPCR, utilizando un I-Cycler (Bio-Rad, USA). Se seleccionaron 5 géneros de bacterias para realizar una estimación de la composición del microbioma: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (ambos probióticos), *Enterococcus*, *Bacteroides* y *Clostridium* (Noratto *et al.* 2014; Song *et al.* 2004). Todos los oligonucleótidos fueron obtenidos a través de gbt oligos (Genbiotech SRL, Buenos Aires, Argentina). Se realizó un primer ciclo de 3 min a 95,0 °C, seguido de 45 ciclos de 30 s a 95,0 °C, 30 s a la temperatura de *melting* de cada primer y 30 s a 72,0 °C, continuado con un ciclo de 1 min a 95,0 °C, y como paso final un ciclo de 2 min a 60,0 °C. La temperatura de *melting* de cada primer se determinó mediante prueba y error. El *threshold* (umbral del número de ciclos (CT) a partir del cual se determina si una muestra amplificó) utilizado fue el definido al realizar la curva de calibración para cada oligonucleótido. La ventana de análisis de datos se estableció en 95.00% de un ciclo, centrado al final del ciclo. Se aplicó el filtrado digital medio ponderado. En todos los casos el volumen final de reacción fue de 15 µL y se utilizó 3 µL de ADN, 7,5 µL de Mezcla Real 2X 100rxn (Biodynamics SRL B124-100, Buenos Aires, Argentina), y agua libre de DNAsas. La concentración de los oligonucleótidos varió entre 250 y 100 µM en cada caso. En todas las determinaciones se realizaron también las curvas de *melting* de las muestras amplificadas para comprobar la pureza de las mismas.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el análisis del perfil de microbioma

Grupo bacteriano	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')	Amplicón (pb)	Cita
Bifidobacterium	BifF: GGGTGGTAATGCCGGATG	BifR: TAAGCGATGGACTTTCACACC	442	Shukla
Enterococcus	Enco-F: CCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	Enco-R: ACTCGTTGTACTIONTCCCATTGT	144	Rintilla
Bacteroidetes	Bac-F: GGTGTCCGGCTTAAGTGCCAT	Bac-R: CGGAYGTAAGGGCCGTGC	140	Rintilla
Lactobacillus	LbF: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	LbR: CACCGCTACACATGGAG	341	Shukla
Clostridium	Cl1F: TACCHRAGGAGGAAGCCAC	Cl1R: GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT	278	Song
Universal	F515: CACGGTCGKCGGCCATT	R806: GGACTACHVGGGTWTCTAAT	300	Knight

#### 7.4.1. Curvas de calibración de los géneros de bacterias seleccionadas

Las curvas de calibración se realizaron amplificando ADN de cultivos puros de las bacterias de los distintos géneros mediante PCR común (Castillo *et al.* 2006), se cuantificó la cantidad de ADN obtenido luego de la amplificación y se realizó una corrida en gel de agarosa para identificar la banda del segmento amplificado. Se realizaron diluciones seriadas de 10, 1, 0,01, 0,001 y 0,0001 ng/ $\mu$ L de ADN y se amplificaron mediante qPCR bajo las mismas condiciones con las que se analizaron las muestras, las cuales se enumeran en la tabla 4. Al realizar cada una de las curvas también se definió el threshold (umbral del número de ciclos a partir del cual se determina si una muestra amplificó a utilizar en cada caso). Esto permitió normalizar la concentración hallada en cada género con el universal, tomando este último como el ADN bacteriano total que contiene cada muestra y calcular, así, el porcentaje de cada una de las bacterias analizadas, y definir un perfil de la composición del microbioma intestinal de las muestras a analizar.

Tabla 4. Condiciones de amplificación de los oligonucleótidos utilizados para analizar el perfil de microbioma intestinal.

Oligonucleótidos	[ $\mu$ M]	T° <i>melting</i>	<i>threshold</i>
Uni R y Uni F	100	52	100
Lb F y Lb R	100	52	100
Bif F y Bif R	250	58	50
Bac-F y Bac-R	250	54	100
Enco-F y Enco-R	250	56	50
Cl1 F y Cl1 R	250	50	50

Se graficaron el número de ciclos (Ct) en función de Log de la concentración de ADN.

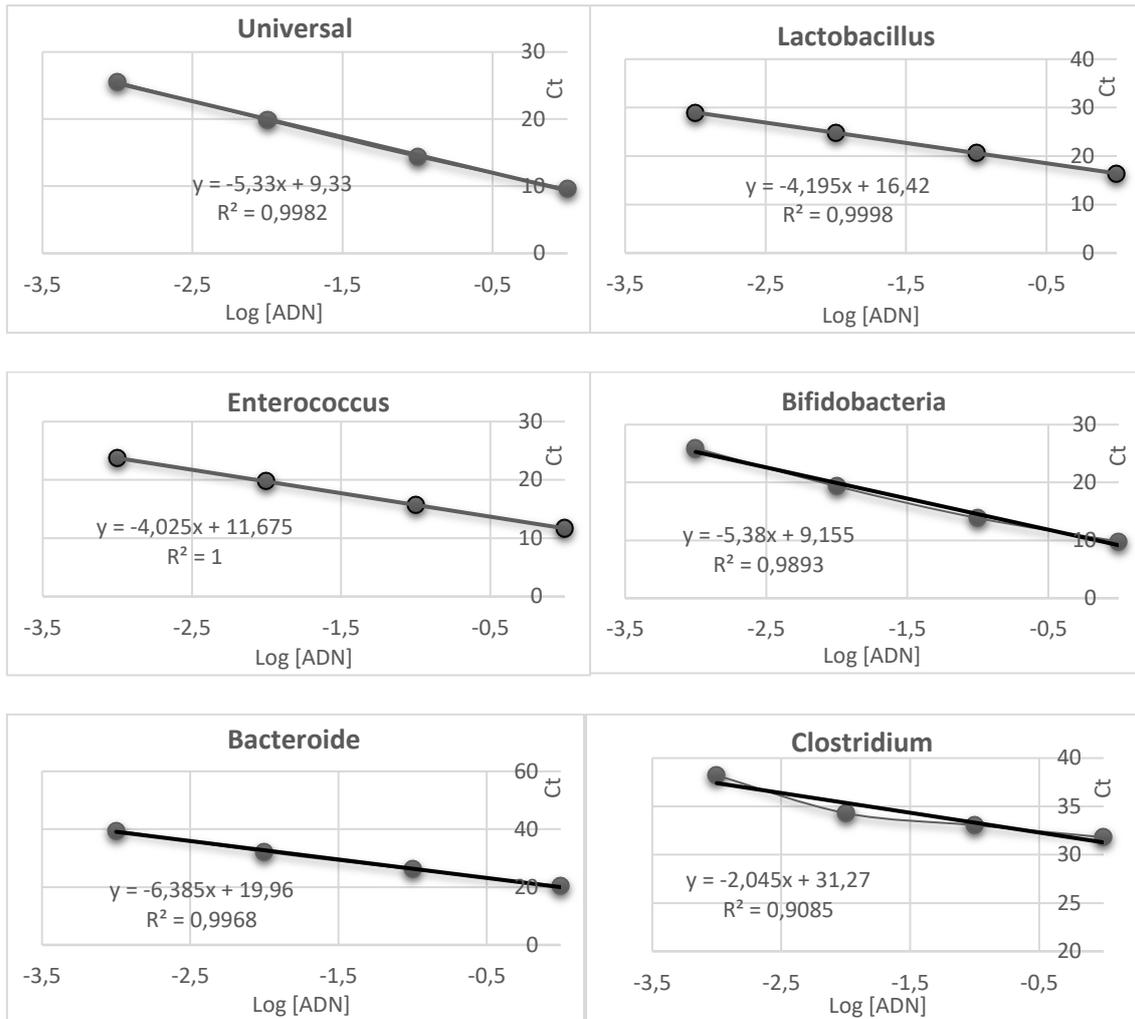


Figura 5. Curvas de calibración de los distintos oligonucleótidos utilizados para analizar el perfil del microbioma intestinal.

Para la cuantificación se calculó el número de copia de cada muestra como:

$$N^{\circ} \text{ de copias} = (1 - E)^{(Ct1 - Ct x)}$$

Donde:

- E es la eficacia del primer calculada como  $E = 10^{(-\frac{1}{a})}$ , siendo a la pendiente de la curva de calibración.
- Ct 1 es el número de ciclos de una sola molécula de ADN.
- Ct x el valor obtenido para la muestra a analizar.

## **7.5. Análisis del perfil del microbioma de ratones con Síndrome de Rett**

Se analizó el perfil del microbioma de ratones mutantes para MeCP2 del modelo MeCP2-308. Estos animales portan un codón prematuro de terminación en el aminoácido 308, generando una proteína MeCP2 trunca que carece de la región C-terminal (Shahbazian *et al.* 2002). En dicho modelo, los signos característicos (dificultades respiratorias, temblores, “*claspings*” de patas traseras) comienzan alrededor de la sexta semana de vida y los animales sobreviven hasta el año de edad.

Este modelo animal (B6.129S-Mecp2<tm1Hzo>/J, Stock 005439) fue obtenido de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y los animales se alojaron en el Bioterio del Departamento de Química Biológica- CIQUIBIC de la Facultad de Ciencias Químicas. Los animales fueron mantenidos en una sala con aire filtrado y condiciones controladas de luz/oscuridad (12h/12h) y temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con provisión de agua y alimento estériles ad libitum (alimento balanceado “Cooperación” irradiado). La colonia se mantuvo en un *background* C57BL/6J, para lo cual hembras heterocigotas portadoras de la mutación en MeCP2 fueron apareadas con machos WT de la cepa C57BL/6J (obtenidos del INIMEC, Córdoba, Argentina). Las crías fueron genotipificadas y en todos los experimentos desarrollados se trabajó con animales wild type (wd) y mutantes (mut) de la misma camada y sólo con ratones machos a fin de evitar las variaciones generadas por el proceso de inactivación aleatoria del cromosoma X, (machos mut: hemicigotas MeCP2308/y). Dado que el gen MECP2 se encuentra en el cromosoma X, las hembras presentan un espectro de manifestaciones y de porcentajes de expresión de los alelos wild type y mutante en los distintos tejidos, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Por eso, en la mayoría de los casos se utilizan los ratones machos wt y mut. Las crías fueron genotipificadas y en esta tesis se trabajó con animales wt y mutantes (mut) de la misma camada, y sólo con ratones machos a fin de evitar las variaciones generadas por el proceso de inactivación aleatoria del cromosoma X, (machos mut: hemicigotas MeCP2308/Y). Dado que el gen MECP2 se encuentra en el cromosoma X, las hembras presentan un espectro de manifestaciones y distintos porcentajes de expresión de los alelos *wild type* y mutantes en los distintos tejidos, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Por eso, en la mayoría de los casos se utilizan los ratones machos wt y mut. En la semana 8 se tomaron muestras de materia fecal de los ratones con sintomatologías leves, de las cuales se extrajo el ADN y se realizó el análisis de composición del microbioma intestinal.

## 8. EFECTO PREBIOTICO *IN VIVO*

Se trabajó con 4 grupos de ratones de la cepa C57BL/6 WT: El grupo 1 (control negativo) con 4 ratones que fueron alimentados sólo con el alimento cooperación (pellet) con agregado de agua ( la misma cantidad de mL correspondientes al peso de Inulina del control positivo), grupo 2 (control positivo) con 4 ratones que consumieron el pellet con el agregado de Inulina a una concentración de 1 mg por g de ratón, tomándose el peso del ratón como el promedio del peso de los ratones de todo el grupo en el momento de la ingesta, el grupo 3 (tratamiento con AXs de trigo blando) con 5 ratones que consumieron el pellet con el agregado de el extracto de AX solubles obtenidos a partir de las líneas experimentales de trigo blando en las mismas concentraciones que el control positivo corrigiendo el peso de extracto con la pureza del mismo, y el grupo 4 (tratamiento con AXs de trigo duro) con 5 ratones tratados de la misma manera que el grupo 3, pero con el extracto de AXs obtenidos a partir de los cultivares de trigo duro.

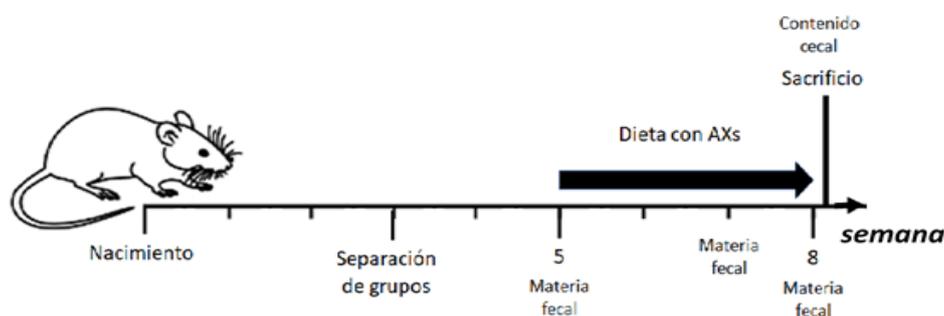


Figura 6. Esquema del tratamiento para el análisis de efecto prebiótico *in vitro*.

A los 21 días del nacimiento los ratones fueron separados en los 4 grupos, ocupando cada grupo una caja en el Bioterio del Departamento de Química Biológica- CIQUIBIC de la Facultad de Ciencias Químicas. Los animales fueron mantenidos en una sala con aire filtrado y condiciones controladas de luz/oscuridad (12 h/12 h) y temperatura ( $22 \pm 2$  °C), con provisión de agua y alimento estériles (alimento balanceado “Cooperación” irradiado). Durante todo el tratamiento los animales tuvieron libre acceso a comida y agua, cuyo consumo por grupo fue registrado. Se realizó un seguimiento del peso de los ratones en el transcurso del experimento. A partir de la quinta semana de vida, se le agregó a cada grupo, cada 3 días, el pellet suplementado con Inulina, los distintos extractos de AXs o el agua, según corresponda a cada grupo, durante 21 días. Los días 0, 15 y 21 del tratamiento se tomaron muestras de materia fecal para la extracción de

ADN y posterior análisis del microbioma intestinal y 3 días anteriores a estas fechas, de manera seriada, para el análisis del contenido de AGCC. Los animales se mantuvieron bajo las condiciones sugeridas por la de guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio NIH (2011). Al final del tratamiento (día 22) los animales fueron anestesiados por administración intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg de animal) y xilacina (10 mg/kg) seguido de eutanasia (dislocación cervical), y se extrajo el contenido cecal de los 18 ratones para el análisis del contenido de AGCC y composición del microbioma, los cuales fueron evaluados de la misma manera que en el caso de la materia fecal. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a -80 °C desde su extracción hasta el momento en el que se procesaron.

### **8.1. Análisis del perfil del microbioma intestinal**

De las muestras de materia fecal tomadas antes de comenzar el tratamiento y al finalizar el mismo, así como las muestras de contenido cecal de los ratones se realizó la extracción de ADN y cuantificación de las cepas mediante qPCR en las mismas condiciones detalladas para el análisis del perfil del microbioma de ratones con Síndrome de Rett (inciso 7.4).

### **8.2. Análisis de ácidos grasos de cadena corta en contenido cecal.**

Se pesaron entre 200 y 400 mg de contenido cecal de los ratones y se diluyeron en 1,5 mL de ácido 2-metil-valérico 0,05% en acetonitrilo. Se colocó en vórtex por 90 s, y una vez homogeneizadas todas las muestras se volvió a poner en vórtex por 30 s más. Se centrifugó 20 min a 10.000 x g a 4 °C, y el sobrenadante se filtró en 0,22 µm. Se inyectaron 3 µL en cromatógrafo gaseoso bajo las mismas condiciones que se especifican en la cuantificación de AGCC de la fermentación *in vitro* (inciso 6.1.).

## **9. PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR EN CELULAS DE CANCER DE COLON**

### **9.1. Línea celular de cáncer de colon**

La línea de cáncer de colon HCT116 fue adquirida en el Banco de Células de Río de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ). Las células se cultivaron en medio de Eagle

modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene penicilina (100 µl/mL) y estreptomina (100 µg/mL) con suero bovino fetal al 10%. Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Se siguió la guía de la ATCC (American Type Culture Collection) para el mantenimiento de las células. Para disociarlas de las placas de crecimiento se utilizó tripsina/EDTA cuando alcanzaron una confluencia de 70 a 90%.

### **9.2. Ensayo de MTT ((4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro)**

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad metabólica celular. Las enzimas oxidorreductasas celulares dependientes de NADPH pueden, bajo condiciones definidas, reflejar la cantidad de células viables presentes. Estas enzimas son capaces de reducir el colorante de tetrazolio MTT 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro a su formazán insoluble, que tiene un color púrpura. Los ensayos con colorante de tetrazolio también se pueden usar para medir la citotoxicidad (pérdida de células viables) o la actividad citostática (desplazamiento de la proliferación a la inactividad) de posibles agentes medicinales y materiales tóxicos.

Se preparó una solución madre de concentración 20 mg/mL de medio de cultivo (DMEM), la cual se filtró con filtro de 22 µm para esterilizar, y se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 10, 5 y 2,5 mg/mL.

En una placa de 96 celdas se colocó 180 µL de células diluidas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) en una concentración de  $5,5 \times 10^4$  en cada pocillo y se incubó a 37 °C 18 h o toda la noche. Cumplido este plazo, se agregaron 20 µL de las distintas concentraciones de los extractos de arabinosidos por cuadruplicado, y se incubó en las mismas condiciones por 72 h. En el tiempo 24, 48 y 72 h, se añadió MTT (0,5 mg/mL) durante 1 h. Los sobrenadantes fueron removidos y los cristales de formazán se solubilizaron con DMSO. La absorbancia a 490 nm se midió en una lectora de microplacas (Bio-Rad, Hercules, CA). La viabilidad de las células en cada tiempo de incubación se expresó en relación con las células no tratadas (control). Se realizó un control positivo de muerte celular agregando tritón 0,2% v/v.

### **9.3. Hidrólisis de los extractos de AX**

Se pesaron 50 mg de extracto de arabinosidos y se disolvieron en 2 mL de buffer de acetato de sodio 5 mM. Se agregaron 10 µL de endo-1,4-β-Xilanas (Megazyme M1 de

*Trichoderma viride* - 120102) y se colocó durante 30 min a 40 °C. Se precipitó con 3 volúmenes de etanol, se centrifugó 1 min a 10000 x g, se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces con etanol 70 %. El hidrolizado se disolvió en 1 mL de acetonitrilo 20 % para el análisis del tamaño molecular HPSEC-RID, del mismo modo que se detalló en 4.2.3, y el resto se disolvió en medio de cultivo (DMEM), y se trató de la misma manera que en el punto anterior para realizar el análisis de viabilidad celular.

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados fueron obtenidos por duplicado o triplicado de cada determinación. Los datos obtenidos de los diferentes estudios se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y los resultados fueron comparados por el Método Fisher, a un nivel de significación del 0,05. Los valores se informan como las medias con la letra correspondiente a este análisis. Las correlaciones entre los parámetros medidos fueron evaluadas por el Método de Pearson y los valores de coeficiente de correlación informados se consideraron significativos con un  $p < 0,05$  y/o  $p < 0,01$ . También se realizaron análisis de la varianza multivariado, comparando los resultados por el Método de Hotelling a un nivel de significancia del 0,05, así como regresiones lineales mediante el método de estimación de cuadrados mínimos. La distribución normal de los datos se corroboró mediante la prueba de qqplot. Estos análisis fueron realizados mediante el programa INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC; Córdoba, Argentina). Se realizaron también comparaciones mediante el t test no paramétrico con un 95% de intervalo de confianza realizados con el programa GraphPad Prisma 6.

## RESULTADOS Y DISCUSION



# *CAPÍTULO 1*

## *COMPOSICION Y TAMAÑO DE PARTICULA DE LAS HARINAS DE GRANO ENTERO*



## 1. TAMAÑO DE PARTICULA DE LAS MUESTRAS DE HARINA

El tamaño de partícula (PSA) de una harina refinada o blanca está relacionado con el grado de dureza del endosperma de los granos y con el método de molienda utilizado. Los trigos de textura blanda ofrecen menos resistencia a la molienda y producen harinas con partículas más finas, mientras que las harinas provenientes de granos más duros poseen partículas de mayor tamaño (Pearson *et al.* 2007; Glenn y Saunders, 1990). Esto significa que, si se someten a molienda distintos trigos bajo las mismas condiciones, las diferencias encontradas en el tamaño de partícula de sus harinas van a estar dadas por la dureza de los granos; con lo que el tamaño de partícula de una harina puede ser usado como un indicador de la dureza de estos. Asimismo, es esperable que harinas que difieren en sus tamaños de partículas muestren diferencias en cuanto a sus propiedades físico-químicas (Wang y Flores, 2000).

En el caso de las harinas integrales no existen hasta el momento métodos estándares disponibles para la molienda del grano entero, lo que resulta en un rango de tamaño de partículas de salvado muy amplio y variado. La literatura sugiere que el tamaño de partícula de salvado moderado es el mejor para la producción de pan (Doblado-Maldonado *et al.* 2012).

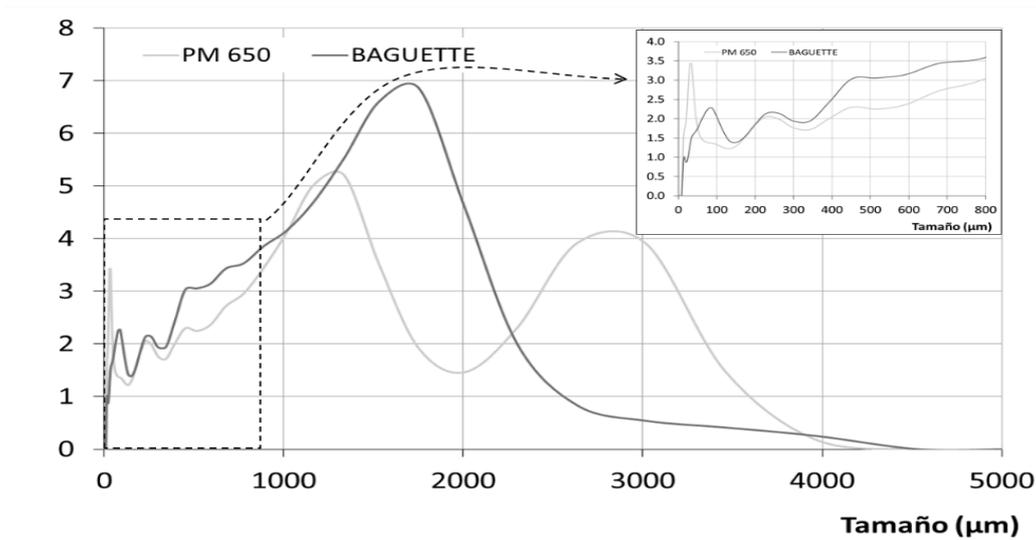


Figura 7. Distribución de tamaño de partícula de las harinas de grano entero de trigo. Con fines comparativos, se graficó una curva representativa de los cultivares de trigo duros (Baguette) y otra de trigo blando (PM 650). En el recuadro de la derecha se muestra una ampliación de la distribución del tamaño de las partículas menores a 800 µm.

En la figura 7 se grafican dos curvas representativas de la distribución del tamaño de partícula de un cultivar de trigo duro (Baguette, línea negra) y uno de trigo blando (PM 650, línea gris).

En general, la harina refinada presenta una distribución trimodal, con una primera moda alrededor de los 10  $\mu\text{m}$ , la segunda entre 10-50  $\mu\text{m}$  y la tercera, entre 50 y 300  $\mu\text{m}$  (Kim *et al.* 2004). En la figura 7 se pueden observar más modas o poblaciones diferentes en el rango de 0 a 1000  $\mu\text{m}$ , y a partir de este valor, se presenta una población de mayor tamaño para el trigo duro (aproximadamente 1800  $\mu\text{m}$ ), y dos para el trigo blando (aproximadamente en 1500  $\mu\text{m}$  y 2800  $\mu\text{m}$ ). Se corroboró por inspección visual que estas partículas correspondían a partículas de salvado o salvado unido a grandes porciones de endosperma. Las poblaciones menores a 1000  $\mu\text{m}$ , por otro lado, corresponderían a partículas de endosperma (harina) y a partículas de salvado o germen más pequeñas. La heterogeneidad de la distribución del tamaño de partícula de estas harinas se verificó macroscópicamente. Hemdane *et al.* (2016) informo una media de tamaño de partícula de salvado determinado por tamizado de 222  $\mu\text{m}$ , significativamente mayor a los resultados de este trabajo, pero no informó si la distribución fue de una sola población homogénea.

El tamaño de partícula de las harinas integrales de trigo es un factor importante que afecta su funcionalidad y la calidad del producto final (Kihlberg *et al.* 2004). Se calcularon las medias de la distribución de tamaño de partícula,  $d_v$  10, 50 y 90, y el span de las distintas muestras (tabla 5). En trabajos de Zhang (1997, 1999), se informaron tamaños de partícula similares a los cultivares que dieron los menores valores. Sin embargo, Noort *et al.* (2010) informaron valores de salvado de trigo similares a los encontrados para las harinas de grano entero.

Los resultados obtenidos con los distintos cultivares de trigo blando fueron muy variables, arrojando valores entre 456 a 2362  $\mu\text{m}$  en las medias de la distribución del tamaño de las partículas. Las líneas de trigo blando PM 687 y PM 692 fueron las que mayor tamaño de partícula de harina se obtuvieron luego de la molienda. PM 682, en cambio, fue el de tamaño más pequeño.

En el caso de las muestras de trigos duros, se observó una menor variabilidad en la distribución del tamaño de partícula obtenido tras la molienda, encontrándose valores medios comprendidos entre 385 y 795  $\mu\text{m}$ , para todos los cultivares con excepción de BIOINTA, cuya media fue de 1640  $\mu\text{m}$ , siendo similar a los cultivares de trigo blando. ACA 315, fue el que mostró el menor tamaño medio.

Tabla 5. Tamaño de partícula de las harinas de grano entero de trigo.

Muestra	Tipo	Media ( $\mu\text{m}$ )	dv 10 ( $\mu\text{m}$ )	dv 50 ( $\mu\text{m}$ )	dv 90 ( $\mu\text{m}$ )	Span
PM 647	Blando	831 ghi	22 ab	531 bc	1038 abc	1,92 abc
PM 650	Blando	1082 j	22 abc	654 cd	2500 h	3,78 ij
PM 663	Blando	544 bcd	23 abcd	319 a	1225 bcd	3,77 ij
PM 673	Blando	738 efgh	32 ef	527 bc	1650 ef	3,07 defghi
PM 679	Blando	672 cdef	30 cdef	407 ab	1417 cde	3,42 fghij
PM 681	Blando	844 hi	22 ab	583 cd	1528 def	2,58 bcdefg
PM 682	Blando	455 ab	19 a	280 a	1199 bcd	4,23 j
PM 686	Blando	918 i	28 bcde	722 d	2101 gh	2,87 cdefghi
PM 687	Blando	2030 l	42 gh	2105 f	3665 ij	1,73 ab
PM 690	Blando	879 hi	28 bcde	635 cd	1882 fg	2,94 defghi
PM 691	Blando	905 i	29 bcdef	604 cd	1596 def	2,60 bcdefgh
PM 692	Blando	2361 m	45 h	3019 g	3862 j	1,26 a
BIOINTA	Duro	1640 k	55 i	1231 e	3358 i	2,77 cdefgh
LE 2330	Duro	680 defg	31 def	257 a	1399 cde	5,34 k
BAGUETTE	Duro	784 fghi	37 fg	517 bc	1693 ef	3,20 efghi
ACA 315	Duro	384 a	26 abcde	3501 a	840 ab	2,37 bcde
ACA 320	Duro	795 fghi	59 i	581 cd	1531 def	2,54 bcdef
K, YARARA	Duro	533 abcd	32 ef	311 a	1366 cde	4,28 j
CRONOX	Duro	521 abc	37 fg	330 a	1214 bcd	3,56 hij
ANIV 75	Duro	458 ab	30 cdef	288 a	669 a	2,22 abcd
GUERRERO	Duro	598 bcde	36 fg	386 ab	1399 cde	3,55 ghij
	BLANDO	1022 B	29 A	865 A	1972 A	2,85 A
	DURO	710 A	38 B	472 A	1497 A	3,32 A

Distintas letras minúsculas en la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes entre cultivares ( $p < 0,05$ ). Diferentes letras mayúsculas corresponden a valores significativamente distintos entre variedades de trigo ( $p < 0,05$ ).

La media del tamaño de partícula de las harinas mostró un valor significativamente mayor para los trigos blandos, siendo este resultado contrario al hallado por Pearson (2007), quien trabajó con harinas refinadas de trigos blandos y duros. El dv 10 también mostró diferencias significativas entre los dos tipos de trigo, pero con un menor valor medio para los trigos blandos. Esto se debe a que en esta fracción se encuentran casi exclusivamente partículas de endosperma, y en el caso del trigo blando estas partículas serían más pequeñas, ya que ofrecen menos resistencia durante la molienda y por lo tanto muestran una media de dv 10 menor que los trigos duros en concordancia con lo encontrado por Pearson (2007). Sin embargo, el salvado de los trigos blandos es de mayor tamaño que el de los trigos duros resultando en una media de tamaño de partícula

mayor (Tabla 5). Se conoce que la capacidad del salvado para reducirse a partículas de menor tamaño durante la molienda varía entre cultivares (Greffeuille *et al.* 2006), lo que explicaría la amplia variabilidad de tamaño de partícula encontrada entre las distintas muestras.

## **2. COMPOSICION DE LAS HARINAS DE GRANO ENTERO**

Se evaluó la composición fisicoquímica de las harinas de grano entero de los 9 cultivares de trigo duro y de las 12 líneas experimentales de trigo blando, ambos tipos de trigos de cultivos locales, siendo los trigos duros los cultivares de mayor consumo en la zona. Los resultados se muestran en la tabla 6. Se calculó la media de cada uno de los parámetros medidos para cada variedad de trigo, y se informó además el valor promedio para las harinas de grano entero de trigo duro y otro para las de trigo blando. Se realizó un ANOVA para determinar diferencias significativas entre los distintos tipos de trigo, así como entre los diferentes cultivares y líneas experimentales.

Las muestras evaluadas arrojaron valores de humedad, fibra dietaria y cenizas similares a los informadas por Bressiani *et al.* (2017) para harinas integrales de trigo de Brasil, y mayores en función de los contenidos de proteínas y MG. Son similares, también, a los reportados por Vignola *et al.* (2017) para harinas integrales de trigos duros argentinos.

Al analizar por separado cada uno de los parámetros medidos en función del tipo de trigo, se observó que sólo hay diferencias significativas para IDF y SDF, siendo mayores para los cultivares de trigo blando. El contenido total de fibra dietética (IDF) hallado en las muestras de harinas integrales de este trabajo (14,12%) fue mayor al reportado por Hung *et al.* (2007) y menor en el caso de SDF.

La calidad del trigo no está sólo determinada por sus componentes mayoritarios, los minoritarios como lípidos, enzimas y polisacáridos no almidonosos (como arabinoxilanos) juegan un papel muy importante en la calidad del producto (Goesaert *et al.* 2005).

Tabla 6. Composición fisicoquímica de las harinas de grano entero de trigo.

MUESTRA	TIPO	SDF	IDF	Cenizas	Proteínas	AXt	AXs	MG
PM 647	Blando	2,43 h	14,33 bcdef	1,69 efgh	15,14 efg	6,09 ab	0,52 abc	2,83 cdefg
PM 650	Blando	2,35 gh	13,98 bcde	1,64 defg	14,47 cde	13,31 ij	0,78 b	2,62 bcde
PM 663	Blando	1,18 abcd	14,69 bcdef	1,99 k	16,06 ij	7,05 abc	0,58 cd	2,80 cdef
PM 673	Blando	2,65 h	14,37 bcdef	1,83 ghijk	16,75 k	14,13 j	0,56 bcd	1,96 a
PM 679	Blando	1,31 abcdef	16,76 def	1,73 fghi	14,75 def	7,94 bcd	0,60 cd	3,27 fgh
PM 681	Blando	1,14 ab	17,50 ef	1,87 hijk	14,48 de	7,04 ab	0,64 d	4,40 i
PM 682	Blando	1,75 def	16,35 cedf	1,72 fghi	16,50 ijk	11,07 fgh	0,76 e	3,30 fgh
PM 686	Blando	1,29 abcdef	15,55 bcdef	1,93 jk	13,90 bc	11,33 ghi	0,57 cd	2,37 abcd
PM 687	Blando	2,51 h	14,44 bcdef	1,79 ghij	17,41 l	9,56 defg	0,57 cd	2,94 defgh
PM 690	Blando	1,05 bcde	13,91 bcdee	1,59 cdef	15,99 hi	8,89 cdef	0,52 abc	2,16 ab
PM 691	Blando	1,73 cdef	17,65 f	1,66 defg	13,52 a	12,64 hij	0,60 cd	2,63 bcde
PM 692	Blando	2,57 h	9,83 bc	1,45 bc	13,20 a	7,60 abcd	0,47 ab	2,54 abcde
BIOINTA	Duro	1,67 bcdef	12,88 abc	1,53 bcde	13,40 ab	11,59 ghi	0,52 abc	2,95 defgh
LE 2330	Duro	1,78 efg	12,85 abc	1,14 a	14,72 def	8,58 cde	0,55 bcd	2,35 abc
BAGUETTE	Duro	1,25 abcde	14,52 bcdef	2,00 k	14,58 def	8,58 cde	0,47 ab	4,69 i
ACA 315	Duro	1,25 abcde	14,79 bcdef	1,71 efghi	16,62 jk	14,31 j	1,07 g	2,76 cdef
ACA 320	Duro	1,15 abc	10,30 a	1,88 ijk	16,83 kl	10,60 efgh	0,44 a	3,41 gh
K, YARARA	Duro	1,27 abcdef	12,92 abc	1,36 efg	15,02 c	10,63 efgh	0,89 f	3,26 fgh
CRONOX	Duro	1,30 abcdef	12,35 ab	1,49 bcd	14,18 cd	5,49 a	0,52 abc	3,12 efgh
ANIV 75	Duro	1,20 abcd	13,23 abcd	1,77 fghij	16,59 jk	14,28 j	0,60 cd	3,01 efgh
GUERRERO	Duro	1,83 fg	15,77 bcdef	2,34 l	15,44 gh	9,01 cdef	0,62 d	3,42 h
T. BLANDO		1,83 B	14,94 B	1,74 A	15,18 A	9,72 A	0,59 A	2,82 A
T. DURO		1,41 A	13,29 A	1,69 A	15,26 A	10,34 A	0,63 A	3,22 A

Fibra dietaria soluble (SDF) Fibra dietaria insoluble (IDF), Arabinosilanos totales (AXt), Arabinosilanos solubles (AXs), y Materia grasa (MG) expresados todos en porcentaje en base seca. Diferentes letras minúsculas corresponden a valores significativamente diferentes entre cultivares ( $p < 0,05$ ) dentro de la misma columna. Diferentes letras mayúsculas corresponden a valores significativamente diferentes entre los tipos de trigo ( $p < 0,05$ ).

En el presente trabajo, no se hallaron diferencias significativas entre el contenido de arabinosilanos en los distintos tipos de trigo, y se observó una gran variabilidad entre cultivares (Tabla 6). En general, la dureza del grano de trigo está correlacionada de manera positiva con mayor contenido de arabinosilanos, tanto solubles como insolubles (Hong *et al.* 1989). Sin embargo, un estudio de Bettge y Morris (2000) encontró que la cantidad de arabinosilanos modificaba la dureza de los trigos blandos mucho más que la de los trigos duros. El amplio rango de valores de arabinosilanos encontrados refleja lo informado por diferentes autores tanto para trigos duros (Dornez *et al.* 2008; Li *et al.* 2009) como para trigos blandos (Finnie *et al.* 2006). Vignola *et al.* (2017) encontró una

gran variabilidad en el contenido de AX t y AXs en harina integral (valores promedio de 9,68% y 0,49%, respectivamente).

A pesar de no encontrar diferencias significativas, en el presente trabajo se hallaron valores mayores de contenido lipídico en los cultivares de trigos duros que en aquellos de trigos blandos, al igual que Panozzo (1993) que encontró que los granos de trigo duro cultivados en Australia tienen niveles más altos de lípidos libres que cultivares de trigo blando. Vignola *et al.* (2017) y Gong *et al.* (2018) informaron valores menores de lípidos (1,07 – 2,65%) a los encontrados en este trabajo.

El contenido proteico de una harina de trigo es un elemento importante a tener en cuenta a la hora de clasificarla para sus posibles usos (Campbell *et al.* 2001; Morris y Rose, 1996). Los trigos blandos generalmente tienen un menor contenido de proteínas totales que los trigos pan o duros (Morris y Massa, 2003; Souza *et al.* 1994); sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre el contenido de proteínas de los distintos tipos de trigo, ya que se obtuvo un valor mayor al esperado en los cultivares de trigo blando. Es de destacar, que el contenido total de proteínas es un parámetro con una alta influencia del ambiente (Vignola *et al.* 2016) que podría explicar los valores inusualmente elevados encontrados. En años de sequía, los granos son más ricos en proteínas por deficiencia de almidón (Cuniberti *et al.* 2016). Aún así, el contenido de proteínas mostró una importante variación entre los diferentes cultivares, y con valores similares a los reportados para trigos blandos (Igrejas *et al.* 2001; Ram y Singh, 2004).

Se realizó un análisis multivariado de la varianza, incluyendo todos los parámetros medidos de la composición fisicoquímica de las harinas integrales, y se encontró que existen diferencias significativas entre las harinas obtenidas a partir de trigo blando y trigo duro (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis multivariado de diferencias entre los dos tipos de trigo.

TRIGO	psa	dv 10	dv 50	dv 90	span	SDF	IDF	CENIZAS	%H	Proteínas	AXt	AXs	MG
BLANDO	1022,09	28,68	865,68	1971,96	2,85	1,83	14,94	1,74	13,09	15,18	9,72	0,59	2,82 A
DURO	710,95	38,16	472,32	1496,71	3,32	1,41	13,29	1,69	13,14	15,26	10,34	0,63	3,22 B

Prueba Hotelling Alfa=0,05. Se informa el valor promedio de todos los cultivares de cada tipo de trigo. Distintas letras indican que los valores son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Se prosiguió a evaluar si la composición de las harinas de grano entero tenía correlación con el tamaño de partícula de las distintas harinas (Tabla 8).

Tabla 8. Correlación entre el tamaño de partícula y la composición de las harinas de grano entero.

PSA	SDF	IDF	AXs	Proteínas	media	dv 10	dv 50
media	0,52**	ns	-0,36*	ns	1		
dv 10	ns	-0,50**	-0,44*	ns	0,49**	1	
dv 50	0,51**	ns	ns	ns	0,95*	0,45**	1
dv 90	0,49**	ns	-0,30*	-0,31*	0,94**	0,49**	0,88**
span	ns	ns	ns	ns	-0,52*	Ns	-0,6**

(\*) indica diferencias con un  $p < 0,005$  y (\*\*) con un  $p < 0,01$ . (ns) indica que no se halló correlación entre los parámetros analizados.

Se encontró que la distribución del tamaño de partícula de las harinas integrales de los distintos cultivares se relacionó con componentes de la fibra dietética. El tamaño medio de partícula correlacionó positivamente con la fibra soluble y negativamente con los AXs. El valor de dv 10 (29 y 38  $\mu\text{m}$  para trigos blandos y duros respectivamente) que corresponde sólo a partículas del endosperma molido y por lo tanto con menor contenido de fibra, correlacionó negativamente con la fibra insoluble y los arabinosilanos solubles. El dv 90 también mostro correlación negativa con los AXs, y en todos los casos (media, dv 10 y dv 90) estaría relacionado al mayor grado de extracción de los AXs cuando el tamaño de partícula es menor. El dv 50 y dv 90, que incluyen partículas de endosperma y salvado, correlacionaron positivamente con la fibra soluble. Esto podría significar una mayor proporción relativa de salvado respecto al endosperma, por ende, mayor proporción de SDF. Sin embargo, las correlaciones con la IDF no fueron estadísticamente significativas.

En resumen, las harinas integrales de trigo duro contienen mayores cantidades de AXt, AXs, cenizas y MG que aquellas de trigo blando, aunque la variabilidad entre los cultivares de ambos tipos de trigo es muy grande. Los trigos blandos, tienen mayor tamaño de partícula medio y aportan valores significativamente mayores de fibra dietética, tanto soluble como insoluble. La composición de las harinas de los dos tipos de trigo es significativamente distinta al ser analizadas de manera global.



## *CAPÍTULO 2*

### *EXTRACCION DE AXs Y EVALUACION DE SU COMPOSICION*



## 1. EXTRACCION DE LOS ARABINOXILANOS DE LAS HARINAS DE TRIGO INTEGRAL

Se extrajeron los arabinosilanos solubles provenientes de las harinas de grano entero de trigos duros y blandos. Al comenzar a realizar las extracciones de las muestras (Tabla 9), se observó que el rendimiento del método de extracción era aproximadamente del 1%, lo cual corresponde con el contenido de AXs informado en el capítulo anterior (se considero rendimiento a la relación entre la cantidad inicial de harina con la cual se realizaba el método y la cantidad de AXs obtenida al final del mismo). La pureza de los extractos fue relativamente baja, lo que concuerda con otros autores que encontraron contenidos elevados de proteínas en sus extractos (Pavlovich et al 2016), como se muestra en la tabla 9.

El rendimiento de otros autores al extraer arabinosilanos totales de salvado fue mayor (Zach et al. 2014), pero en este trabajo se priorizó la extracción de los AXs a partir de las harinas de grano entero utilizando solamente agua como solvente a fin de preservar la estructura original de las moléculas como se encuentran en la harina integral de los dos tipos de trigo.

Tabla 9. Rendimiento y pureza de la extracción de los AXs de diferentes cultivares de trigo.

Muestra	Harina (g)	Extracto (mg)	[AXs]	Rendimiento
Yarara	20,18	196,3	23 %	0,97 %
Cronox	19,98	288,7	36 %	1,45 %
Aca 320	20,26	189,5	21 %	0,94 %
Baguette	18,03	202,3	31 %	1,12 %
PM 691	20,25	210,5	41 %	1,04 %
Aca 315	20,77	199,9	33 %	0,96 %
PM 679	19,99	201,5	39 %	1,01 %

Debido a que se necesitarían cantidades considerables de extracto de AXs para la determinación de la capacidad prebiótica *in vitro*, *in vivo* y para la caracterización química, se decidió realizar cuatro grupos de harinas de grano entero de acuerdo con el contenido de arabinosilanos solubles y el tipo de trigo. Los extractos se obtuvieron a partir de las harinas integrales de los siguientes cultivares:

- AX1: trigos blandos con una concentración de AXs en la harina de menos de 0,7g%. (PM 663, PM 681, PM 673);
- AX 2: trigos blandos con una concentración de AXs en la harina mayor que 0,7g% (PM 682, PM 650);
- AX 3: trigos duros con una concentración de AXs en la harina de menos del 0,7g% (Cronox, ACA 320, Baguette);
- AX 4: trigos duros con una concentración de AXs mayor en la harina mayor a 0,7g% (Klein Guerrero, Klein Yarará).

Una vez obtenidos los extractos se cuantificó la concentración de arabinosilanos solubles que contenía cada uno de ellos por medio del método de Orcinol-HCl (Hashimoto, 1987), misma técnica que se les realizó a las harinas de grano entero para evaluar su composición (inciso 3.6). Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Rendimiento y pureza de los extractos de AXs de pools de harinas de grano entero de trigo.

Extracto	[AXs] (%)	Rendimiento (%)
<b>AX 1</b>	39 a	1,0 %
<b>AX 2</b>	38 a	1,1 %
<b>AX 3</b>	45 b	0,9 %
<b>AX 4</b>	44 b	1,2 %

[% AXs]: % de arabinosilanos solubles en el extracto de arabinosilanos. Distintas letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

El contenido de AXs de los extractos varió entre 39 y 45%, siendo significativamente mayor el contenido total de arabinosilanos solubles en los extractos obtenidos a partir del trigo duro. Buksa *et al.* (2014) obtuvo similares resultados de pureza que los hallados en este trabajo, de entre el 39 y 68% de arabinosilanos de la extracción a partir de harina

de arroz. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los extractos AX 1 y 2, ni entre AX 3 y 4. Esto es esperable debido a que corresponden a extracciones de distintos cultivares, pero del mismo tipo de trigo.

### 1.2. Caracterización de los extractos de AX

Para realizar la cuantificación de arabinosa, xilosa y glucosa mediante HPLC, primero se debió corroborar que las muestras no contuvieran manosa ni galactosa, ya que los mismos tenían tiempos de retención muy similares al de la xilosa en la columna de HPLC con la que se trabajó (Tiempo de retención (Tr) manosa: 13,26; Tr xilosa: 13,49; Tr galactosa: 13,74). Se realizó entonces, primero la detección de los azúcares mediante cromatografía gaseosa con un detector de espectrometría de masas. Al correr los cuatro extractos de arabinoxilanos por el cromatógrafo gaseoso, se pudo corroborar que ninguno contenía manosa ni galactosa, o bien, las cantidades halladas eran despreciables, como se muestra en la tabla 11 y 12.

Tabla 11. Composición de azúcares de los extractos de AXs determinada por CG.

<b>Extracto</b>	Manosa	Galactosa
<b>AX 1</b>	0,00 a	1,50 a
<b>AX 2</b>	0,00 a	7,84 b
<b>AX 3</b>	0,00 a	5,54 b
<b>AX 4</b>	2,77 b	4,43 b

Concentraciones de los distintos azúcares en los extractos (mg/g).

Una vez confirmado que el contenido de estos azúcares era despreciable frente a la concentración de arabinosa y xilosa, se procedió a realizar la cuantificación de xilosa, arabinosa y glucosa mediante HPLC. También se calculó el índice arabinosa/xilosa (ara/xil) que estima el nivel de sustitución en el polímero.

Tabla 12. Composición de azúcares de los extractos de AXs determinada por HPLC.

Extractos	Xilosa	Arabinosa	Glucosa	Ara/xil
<b>Ax 1</b>	147,27 a	67,44 a	9,87 a	0,46 ab
<b>Ax 2</b>	183,04 b	92,87 b	2,98 a	0,51 b
<b>Ax 3</b>	177,41 b	71,44 a	35,15 b	0,40 a
<b>Ax 4</b>	186,99 b	91,50 b	156,64 c	0,49 b

Valores de azúcares en mg/g de extracto. Letras diferentes en las mismas columnas indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

La concentración de xilosa de los extractos fue significativamente menor en el caso del AX 1, obtenido a partir de harinas de trigos blandos con baja concentración de arabinosidos solubles. El AX 3 fue en el que se encontró la menor relación ara/xil, y los AX 2 y 4 fueron los que arrojaron los índices significativamente mayores. Saulnier *et al.* (2007) también informaron valores de xilosa similares a los valores informados en este trabajo y una proporción de ara/xil menor a 1 en muestras extraídas de salvado de trigo, harina refinada y harina de trigos integrales. Asimismo, Barron *et al.* (2006) informó valores similares de ara/xil.

El grado de sustitución de los arabinosidos afecta sus propiedades fisicoquímicas (Dervilly *et al.* 2000). La relación ara/xil indica el grado de ramificación en la cadena, pero es sólo un indicador aproximado de la estructura molecular, la cual se describe mejor por el patrón de sustitución de la columna vertebral xilosa. En cereales, esta relación puede variar de 0,3 a 1,1 (Barron *et al.* 2006), y varía con el cultivar (Izydorczyk y Dexter, 2008). En el trigo, el grado de ramificación depende del tipo de pared celular y se pueden observar grandes variaciones dentro de un mismo tipo de pared. Los arabinosidos en el pericarpio exterior, el escutelo y el eje embrionario tienen un grado de sustitución relativamente alto de arabinosa ( $\text{ara/xil} > 1$ ), mientras que los de aleurona ( $\text{ara/xil} < 0,5$ ), y especialmente la capa hialina ( $\text{ara/xil} < 0,3$ ) están menos sustituidos (Antoine *et al.* 2003; Barron *et al.* 2006). La proporción en el endosperma de trigo generalmente varía de 0,50 a 0,71. Las muestras de arabinosidos con las que se trabajó se obtuvieron a partir de la harina de grano entero, es decir que se encuentran todas las capas del grano de trigo, lo cual podría explicar que no se observen diferencias significativas en ara/xil.

## 2.2. Extractos de trigo duro y de trigo blando

Con el objeto de evaluar la actividad prebiótica de los extractos de arabinosilanos en un modelo *in vivo* se decidió trabajar con dos extractos, uno de trigos blandos y el otro de trigos duros, ya que se observaron diferencias estructurales entre ambos tipos de trigo con los primeros 4 extractos obtenidos. Como se describió anteriormente, el rendimiento de la extracción era muy bajo, por lo cual fue preciso realizar un pool de harinas de grano entero a partir de la cual extraer los AX solubles.

Se obtuvieron los dos extractos de la misma manera que en el apartado anterior, uno compuesto por las harinas Klein Yarara, ACA 315 y Guerrero de cultivares de trigo duro (AX d) y otro con las muestras PM 647, PM 675, PM 690 y PM 692 de líneas experimentales de trigos blandos (AX b). Se analizó la pureza mediante la cuantificación de los AXs finales en los extractos, el contenido de proteínas y la cantidad de arabinosa, xilosa y glucosa en cada uno de ellos. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Composición de los extractos de AXs de trigo duro y blando.

	AX b	AX d
AXs (%)	33,11 a	45,47 a
proteínas (%)	14,81 a	16,75 a
arabinosa (mg/g)	115 a	135 a
xilosa (mg /g)	228 a	285 a
glucosa (mg/g)	41 a	34 a
ara/xil	0,50 a	0,47 a

Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los parámetros evaluados dentro de los distintos extractos. Los valores hallados fueron también, en estos casos, similares a los informados por Saulnier *et al.* (2007) y Barron *et al.* (2006). Maes y Delcour (2002), observaron que AXs del salvado de trigo tenían una relación arabinosa/xilosa de 0,45, pero la precipitación gradual de los AX con etanol cambió la relación que varió de 0.31 a 0.85, según el porcentaje de etanol usado. En este trabajo los AXs se precipitaron con etanol/acetona (1:1).

La extracción de AX en todos los casos (incluyendo pruebas realizadas anteriormente para poner a punto la técnica cuyos resultados no se muestran en este trabajo) mostró rendimientos mayores para el caso de los trigos duros. Los trigos blandos, como se discutió en el capítulo anterior, mostraron una media de tamaño de partícula significativamente mayor a la de los duros. Reis *et al.* (2015) demostró que el tamaño de partícula a partir del cual se extraían los AXs mostraban diferencias en cuanto al rendimiento y caracterización de los mismos. También concluyó que, cada fracción de grano se puede seleccionar para obtener diferentes estructuras de AX de distintos grados de polimerización y ramificación. Saulnier *et al.* (2007) remarca en su trabajo que existen diferencias estructurales y funcionales de los AX extraídos de las distintas capas del grano de trigo. Las variaciones en la estructura de los AX se relacionan con el tejido de origen, y es diferente en las distintas variedades. El tamaño de partícula final de las harinas integrales, depende de la capacidad de quiebre de las distintas capas del grano durante la molienda. Como en este trabajo las muestras son harinas de grano entero, y contienen todas las capas del grano y se han encontrado importantes diferencias entre los tamaños de partícula de las harinas de los dos tipos de trigo (capítulo 1), es de esperar que el extracto contenga AXs con alta variabilidad estructural.

Las diferencias halladas en cuanto a la extracción de los AX en los trigos duros y blandos, podría deberse también a la dureza de los granos a partir de los cuales se obtuvieron las harinas con las que se trabajó. Zhou *et al.* (2017) informó que la distribución de las proteínas de los granos de trigo son variables en las distintas capas del grano y en los distintos tipos, por lo que a pesar de no hallar diferencias significativas en el contenido total de proteínas de las harinas de grano entero de los distintos tipos de trigo (Tabla 6), puede ser distinta la concentración de estas en las distintas capas. Se sabe que hay una correlación positiva entre el contenido de proteínas de la capa externa del grano del trigo, y la dureza del mismo (Swanston *et al.* 2012) y que, a su vez, esto modifica la extracción de los distintos componentes de las harinas de trigo (Budny *et al.* 2016).

### 2.3. Cuantificación de $\beta$ -glucanos en los extractos

Debido a que en la cuantificación de azúcares de los extractos se encontró glucosa, se evaluó la posible contaminación con  $\beta$ -glucanos (Tabla 14), ya que estos compuestos pueden influir en los efectos evaluados. Las cantidades halladas fueron nulas o despreciables, descartando la influencia sobre los resultados.

Tabla 14. Concentración de  $\beta$ -glucanos en los extractos de AXs.

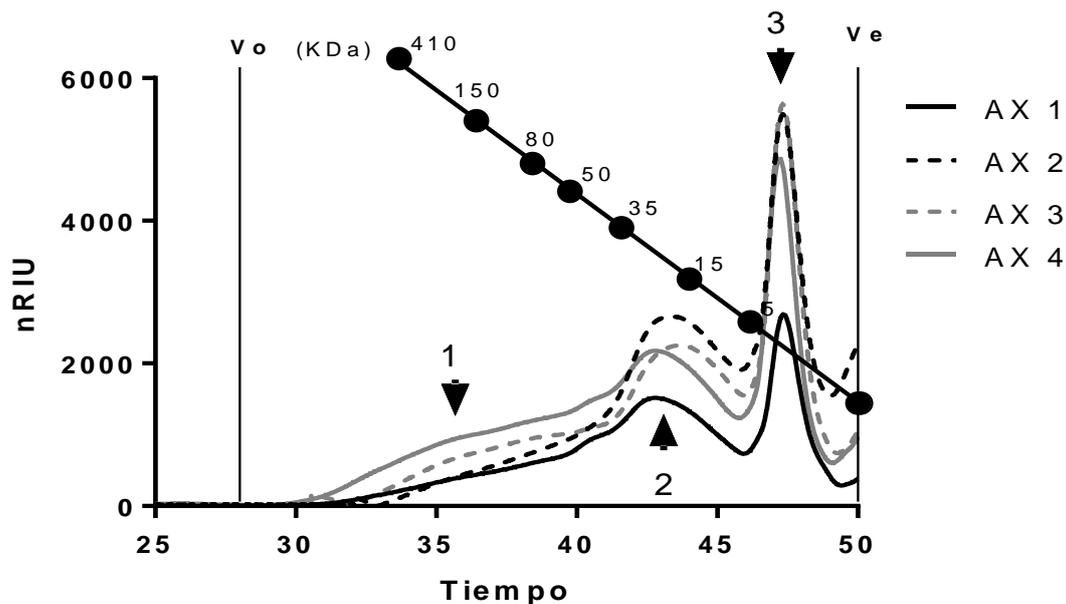
Extracto	mg %
AX D	0,00 a
AX B	0,00 a
AX 1	0,69 d
AX 2	0,12 b
AX 3	0,44 c
AX 4	0,15 b

Los resultados se expresan en mg cada 100 g de extracto. Distintas letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

#### 2.4. Análisis de la distribución del tamaño molecular de los AXs

Se realizó un análisis de la distribución del tamaño molecular de los distintos extractos obtenidos mediante HPSEC. En la figura 8 se muestra los perfiles de los extractos AX1 a AX4 y en la figura 9 los correspondientes a los extractos AX b (trigos blandos) y AX d (trigos duros). La longitud de la cadena de los polímeros es un determinante de sus propiedades físico-químicas (Saulnier *et al.* 2007), y tienen un alto índice de polidispersidad (Dervilly *et al.* 2000; Dervilly *et al.* 2002).

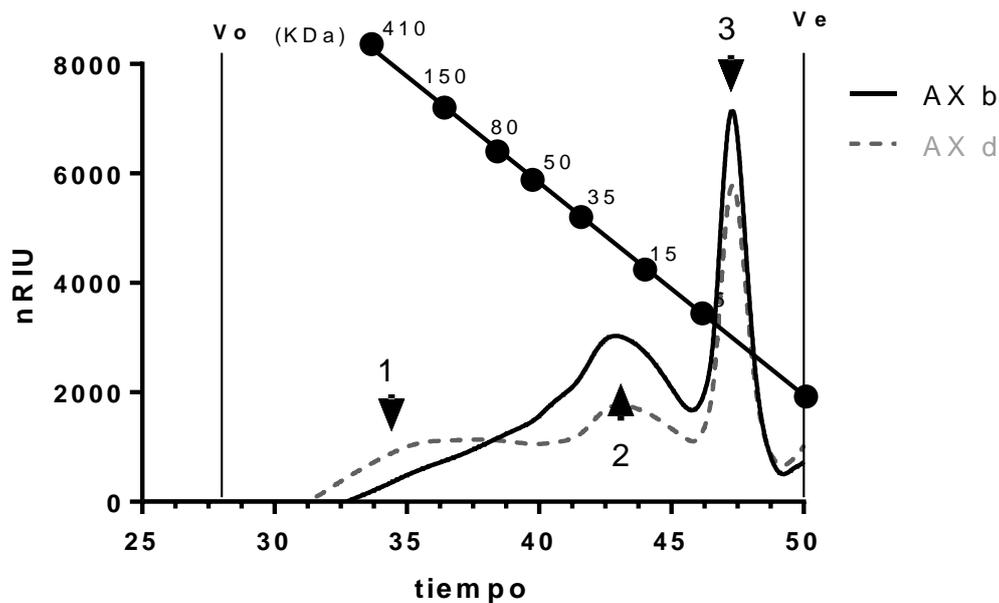
En todos los extractos, entre el 40 y 60% del tamaño molecular (TM) se encuentra entre 22 y 33 KDa, siendo más grande el TM del pico con mayor proporción (pico 2) para los AX 1 y AX 2 obtenidos del trigo blando, que para los extraídos a partir de trigos duros. Aproximadamente el 25 % corresponde a polímeros de 4-5 KDa, y entre un 9 a 20 % de las áreas de distribución del TM corresponden en todos los casos al TM de glucosa (el cual no se muestra en la figura, ya que corresponde al límite de detección de la técnica), cuyos porcentajes concuerdan con las cantidades cuantificadas mediante HPLC. Las dos muestras de los AXs de trigos duro (AX 3 y AX 4), muestran además un pico que corresponde a polímeros de mayor tamaño molecular (entre 400 y 50 kDa) y que representa el 18 % de la distribución y que no se encuentra en los extractos de los trigos blandos.



Picos	AX 1 (blando)	AX 2 (blando)	AX 3 (duro)	AX 4 (duro)
1	-	-	148.63 KDa	155.69 KDa
2	32.46 KDa	32.84 KDa	22.58 KDa	25.53 KDa
3	4.54 KDa	4.86 KDa	4.61 KDa	4.60 KDa

Figura 8. Distribución de tamaño molecular de los extractos de AXs. En la tabla se informa el valor medio de las moléculas que eluyen en cada pico.  $V_0$  es el volumen de tiempo muerto de la corrida, y  $V_e$  el volumen de elución de la misma. Los puntos de la curva indican los TM de los estándares utilizados para la curva de calibración ( $y = -0.1876 x + 9.5449$ ;  $R^2 = 0.998$ ).

La distribución de tamaño molecular de los extractos obtenidos de los pools de harinas de grano entero de los dos tipos de trigo mostró el mismo comportamiento que los extractos mostrados en la figura 8. El perfil del extracto AX d muestra un pico de mayor TM (mayor a 50 KDa) que corresponde al 25% del total, el cual no se observa en AX b. Entre el 50 y 60 % de las moléculas corresponden a un tamaño molecular de entre 29 y 32 KDa, siendo menor el de los polímeros del trigo duro, y se observó otro pico de 4,6 KDa que comprende al 18% del total. También se observó un pico correspondiente a glucosa. Lempereur *et al.* (1997) informó que los arabinosanos de los trigos duros se caracterizaban por tener mayores niveles de arabinosa (de sustitución) y por ende mayor peso molecular. En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de trigo (Tabla 13).



pico	AX duro	AX blando
1	102 KDa	-
2	29.16 KDa	31.23 KDa
3	4.63 KDa	4.68 KDa

Figura 9. Distribución de tamaño molecular de los extractos de AXs de los dos tipos de trigo. En la tabla se informa el valor medio de las moléculas que eluyen en cada pico.  $V_o$  es el volumen de tiempo muerto de la corrida, y  $V_e$  el volumen de elución de la misma. Los puntos de la curva indican los TM de los estándares utilizados para la curva de calibración ( $y = -0.1876 x + 9.5449$ ;  $R^2 = 0.998$ ).

Dervilly *et al.* (2000) informo tamaños moleculares menores para arabinosilanos de trigo extraídos mediante otra metodología. Maes y Delcour (2002) hallaron una población de AX de peso molecular de 50 kDa que precipitaron con distintas concentraciones de etanol menores al 40% y otra con un TM aparente mucho más bajo precipitado con concentraciones más altas de etanol (entre 50 y 80%). Informaron también, que los AXs precipitados con un 40 % de etanol mostraron un peso molecular de aproximadamente 20 KDa, similares a los encontrados en este trabajo.

Rumpagaporn *et al.* (2015) también observaron perfiles de distribución de tamaño molecular de amplio rango al analizar extractos de arabinosilanos de salvado de trigo. Estas diferencias podrían deberse a distintos patrones de sustitución de la cadena lateral que están presentes dentro del conjunto de moléculas (Adams *et al.* 2004), y a que en el presente trabajo también están incluidos los AXs del endosperma del grano.

Los perfiles de elución de otros estudios mostraron dos picos polidispersos con un TM aparente de 100–120 kDa respectivamente y 5–10 kDa (Maes y Delcour, 2002), el primer pico es muy similar al observado en el AX d, AX 3 y AX 4 extraídos a partir de trigos duros. El pico más pequeño fue observado en todas las muestras de este trabajo.

La diversidad estructural de AX ha sido extensivamente estudiada con el objetivo de relacionar la estructura con sus propiedades funcionales. Claramente, las mayores diferencias en AX se basan en la estructura y se relacionan con el tejido de origen, especialmente en las partes externas del grano. La relación entre esta variación estructural y las propiedades funcionales de AX se cree se deben especialmente al nivel de sustitución por cadenas laterales de arabinosa y la presencia de ácido ferúlico (Saulnier *et al.* 2007). Por otro lado, el método de extracción (tiempos, temperaturas, tratamientos enzimáticos) y las características físicas de las muestras de partida condicionan el rango de tamaños molecular de los AXs extraídos y la abundancia relativa de los diferentes picos (Saulnier *et al.* 2007; Maes y Delcour, 2002).

En resumen, los AXs fueron mas fácilmente extraíbles a partir de los trigos duros, cuyos extractos mostraron un porcentaje de moléculas de mayor tamaño que el AX b. No se encontraron diferencias significativas entre el nivel de sustitución de los arabinoxilanos de los extractos (ara/xil), debido a que las harinas a partir de las cuales se realizaron los extractos son de grano entero y contienen todas las capas del grano.

## *CAPÍTULO 3*

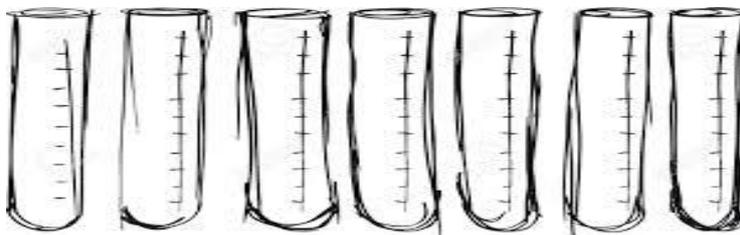
### *EVALUACION DEL EFECTO PREBIOTICO IN VITRO*



## 1. EFECTO PREBIOTICO DE LOS EXTRACTOS DE AX IN VITRO.

A partir de los cuatro extractos obtenidos (AX1 a AX4) se procedió a medir su potencial efecto prebiótico *in vitro*, utilizando las siguientes cepas bacterianas: *L. reuteri*, *B. breve*, *B. fragilis* y *Cl. perfringens* para determinar el CR y AP, y el IP (Gibson y Fuller, 2000). Se seleccionaron dos cepas probióticas y dos de las cepas que se encuentran en mayor concentración en el intestino humano, que no deberían aumentar su metabolismo y crecimiento de manera importante frente a los compuestos prebióticos. De esta manera se obtiene una idea global sobre el tipo de modulación que el arabinosilano es capaz de ejercer sobre el microbioma intestinal. *E. coli* se utilizó como cepa de referencia. Además de incubar las distintas cepas con los 4 extractos de AXs, se incluyó a la Inulina como control positivo y en todos los casos se agregó un tubo con medio semidefinido inoculado con bacteria, pero sin el agregado de ningún hidrato de carbono como control negativo.

(-) **Glucosa Inulina AXS 1 AXS 2 AXS 3 AXS 4**



### 2.1. Crecimiento Relativo (CR)

El crecimiento relativo indica la diferencia de crecimiento de una bacteria con el compuesto con potencial prebiótico a analizar y glucosa. Valores mayores a 1 indican que la bacteria tiene preferencia por el compuesto. El CR de cada una de las cepas analizadas no mostró diferencias significativas entre los extractos y el control positivo (inulina) o fue ligeramente mayor para algunos extractos de AX, como el caso del CR de *Lactobacillus* en presencia del AX 3. Los resultados obtenidos de CR de todas las cepas analizadas se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Crecimiento Relativo de las cepas bacterianas evaluadas en presencia de los extractos de AXs y la inulina.

<b>Extractos</b>	<b><i>Clostridium</i></b>	<b><i>Bacteroides</i></b>	<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Bifidobacteria</i></b>
<b>Inulina</b>	0,95 a	1,18 a	1,00 a	1,05 a
<b>AX 1</b>	1,01 a	1,47 c	1,03 ab	1,09 a
<b>AX 2</b>	1,09 a	1,32 b	0,99 ab	1,17 a
<b>AX 3</b>	0,95 a	1,40 bc	1,26 c	1,20 a
<b>AX 4</b>	1,02 a	1,37 bc	1,14 bc	1,24 a

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

El crecimiento de *C. perfringens* y *B. breve* no mostró diferencias significativas en ninguno de los extractos, ni en comparación con el control positivo. En cuanto a *B. fragilis* el AX 1 mostró el crecimiento más alto y todos los extractos obtuvieron mayores índices que el caso de la inulina. Cabe destacar que, como se mostró en el capítulo anterior, los extractos de los trigos blandos mostraban AXs de mayor TM para el pico de mayor abundancia (pico 2, figura 8) que los trigos duros, y que estas cepas se caracterizan por ser más eficientes en el metabolismo de carbohidratos complejos con mayor peso molecular (Van Laere *et al.* 1999).

El CR de ambas bacterias probióticas, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, resultó igual o mayor que el control positivo utilizado para todos los extractos (Tabla 15). Estos resultados muestran la capacidad de estas bacterias probióticas para metabolizar de manera eficiente AX en comparación con la glucosa.

*L. reuteri* mostró un crecimiento significativamente mayor en el caso de los extractos provenientes de las harinas de trigo duro, obteniendo el mayor puntaje con el AX 3. Además, el CR a las 24 h para estos extractos de AX fue mayor que los extractos de inulina informados previamente por Rubel *et al.* (2014).

Estos resultados indican que todas las cepas analizadas tienen la capacidad de degradar y metabolizar los arabinosilanos. Se ha identificado la presencia de bacterias que poseen enzimas para la degradación de arabinosilanos en el intestino humano (Grootaert *et al.* 2007). Entre ellas especies de *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Clostridium* no patógenos son generalmente las más eficientes en la degradación de carbohidratos complejos como AX (Van Laere *et al.* 1999). No se han identificado *bifidobacterias* que produzcan xilanasas; sin embargo, si se han hallado *bifidobacterias* capaces de producir  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y  $\beta$ -xilosidasa. Aun así, se sabe que en un ambiente intestinal

existe una estrecha cooperación con bacterias productoras de xilanasas y el metabolismo de *bifidobacterias* (Grootaert *et al.* 2007).

Es importante resaltar que, al realizar mediante ANOVA comparación entre el CR de *E. coli* (cepa de referencia), y las cepas probióticas (Lb y Bif) inoculadas con inulina y los distintos extractos, se observó que, en todos los casos, con excepción del AX 1, el crecimiento de *E. coli* era significativamente menor (Tabla 16).

Tabla 16. ANOVA de los crecimientos relativos de las cepas inoculadas.

CR	Inulina	Axs 1	Axs 2	Axs 3	Axs 4
<b>E. coli</b>	0,74 a	0,83 a	0,82 a	0,83 a	0,86 a
<b>Cl</b>	0,91 b	1,12 a	1,09 a	0,95 a	1,02 b
<b>Lb</b>	0,95 b	1,03 a	0,99 b	1,26 b	1,14 b
<b>Bif</b>	1,05 b	1,09 a	1,15 b	1,24 b	1,20 b
<b>Bac</b>	1,18 c	1,47 a	1,32 b	1,40 b	1,37 c

Distintas letras indican diferencias significativas entre el perfil del microbioma intestinal de los distintos grupos con un  $p < 0,05$ .

Asimismo, se analizó el crecimiento de las distintas cepas ente un mismo compuesto (inulina o los distintos extractos) y se observó que era diferente. El crecimiento *Bf. breve*, y *B. fragilis*, fue significativamente mayor al de *C. perfringes* y *L. reuteri* con inulina y con todos los extractos de AX. Sólo en el caso del AX 3, fue también significativamente mayor el crecimiento del *Lactobacillus*.

### 1.2. Actividad Prebiótica (AP)

La actividad prebiótica es el resultado de la diferencia entre el crecimiento relativo de cada bacteria a analizar, y el crecimiento relativo de una cepa de referencia en las mismas condiciones. En este caso se utilizó *E. coli*, la cual no posee actividad prebiótica.

Se calcularon las AP para *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides* (Tabla 17). En cualquiera de estos casos, el prebiótico es usado selectivamente por el microorganismo probiótico en relación a la glucosa o la utilización es limitada en relación a la glucosa por parte de microorganismos patógenos (Rubel *et al.* 2014).

Tabla 17. Actividad prebiótica de las cepas bacterianas evaluadas en presencia de los extractos de AXs y de inulina.

<b>Extracto</b>	<b><i>Clostridium</i></b>	<b><i>Bacteroides</i></b>	<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Bifidobacteria</i></b>
<b>Inulina</b>	0,21 a	0,41 a	0,18 ab	0,28 a
<b>AX 1</b>	0,15 a	0,61 b	0,17 ab	0,23 a
<b>AX 2</b>	0,15 a	0,39 a	0,06 a	0,25 a
<b>AX 3</b>	0,07 a	0,52 ab	0,37 c	0,36 a
<b>AX 4</b>	0,15 a	0,51 ab	0,27 bc	0,33 a

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

Los extractos de AX dieron resultados superiores a 0, lo que indicó que todos tenían actividad prebiótica. Los valores obtenidos para *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* fueron iguales o mayores que la inulina para todas las muestras, excepto para AX 2, el cual arrojó un valor menor al del control positivo (inulina) en el caso de la AP de *L. reuteri*.

*B. fragilis* fue la cepa con mayores valores de AP, tanto en el caso del control positivo como en los extractos, siendo al igual que el CR, AX 1 el que arrojó el valor mas alto. Las cepas de *Bacteroides* poseen actividad de endo-xilanasas y arabinosidasas que permiten degradar AX (De Filippo *et al.* 2010). Los altos valores de AP obtenidos para esta cepa se pueden explicar por esta capacidad. El aumento en *Bacteroides* no es un resultado indeseable ya que este grupo con su actividad endo-xilanasas produce oligosacáridos que son utilizados por *Bifidobacterium*. Además, el aumento en *Bacteroides* está asociado a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) beneficiosos para la salud (Hughes *et al.* 2007).

Otros estudios previos indicaron que el salvado de avena, que contiene altos niveles de glucano y arabinoxilanos, estimula selectivamente el crecimiento de cepas probióticas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Vardakou *et al.* 2007; Jaskari *et al.* 1998), y que los hidrolizados de arabinoxilanos eran utilizados por especies bifidobacterianas (Vardakou *et al.* 2007; Yamada *et al.* 1993), lo cual es concordante con los resultados de AP positivos en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Crittenden *et al.* (2002) encontró que muchas especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* pudieron crecer con altos rendimientos usando xilooligosacaridos (XOS), que también fueron fermentados eficientemente por algunos *Bacteroides*, pero no por *E. coli*, *Clostridium difficile* o

*Clostridium perfringens*. La capacidad de XOS, para aumentar el número de *Bifidobacterium* y suprimir el crecimiento de *Clostridium* ha sido también reportado (Izumi *et al.* 2001).

### 1.3. Índice Prebiótico (IP)

El IP relaciona el crecimiento de ambas cepas probióticas conjuntamente con el de *Bacteroides* y *Clostridium*, haciendo un análisis más completo del efecto de los extractos. Permite cuantificar el efecto prebiótico en lugar de evaluaciones que son únicamente cualitativas, y se basa en el crecimiento de grupos bacterianos claves durante la fermentación (Palframan *et al.* 2003). La ecuación supone que un aumento en las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* es un efecto positivo, mientras que un aumento en *Bacteroides* y *Clostridium* es negativo. Los resultados encontrados se exponen en la figura 10. El índice prebiótico de los extractos de AX alcanza valores entre 0,06 y 4,09. Los valores de IP para AX 2 y AX 4 son similares al de la inulina comercial (2,61). AX 3 fue significativamente más alto que el control positivo.

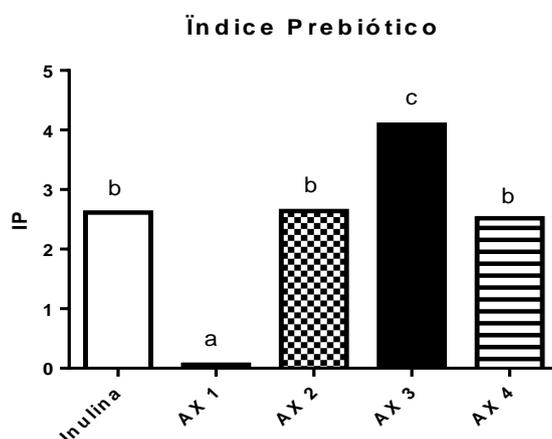


Figura 10. Índice prebiótico de inulina y de los extractos de AX de trigo. Distintas letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

Los extractos AX 2, AX 3 y AX 4 presentaron los valores mayores y arrojaron resultados incluso más altos que otros IP informados para AX de acuerdo a lo reportado por Palframan *et al.* (2003). El extracto AX 3, fue el del valor de IP significativamente mayor.

Este se obtuvo a partir de un pool de harinas de grano entero de trigos duros cultivados en la Argentina. AX 1 presenta el IP más bajo, y es el extracto de harinas de trigo blando con menor concentración de arabinoxilanos, y con mayor AP y CR para *B. fragilis*. El AX 3, derivado de trigo duro fue el que arrojó los valores de AP, y el CR más altos para *L. reuteris* y el que dio el IP significativamente más alto. Vardakou *et al.*, (2008) obtuvieron IP de 1,15 y 2,42 para AX tratados y no tratados con xilanasa, respectivamente.

Los valores obtenidos en este ensayo fueron similares a los informados por Gong *et al.* (2018), quien calculó el IP con la misma fórmula que utilizamos en este trabajo (Palframan *et al.* 2003), y evidenció que los valores de IP de los extractos de arabinoxilanos obtenidos de las harinas de grano entero fueron significativamente más altos que los de las harinas refinadas del mismo cultivar. Vardakou *et al.* (2008) analizó el efecto de los arabinoxilanos insolubles en agua derivados del trigo y obtuvo una puntuación del índice prebiótico de 2,03, menor a los IP hallados en este trabajo para los AX solubles de trigo. El pretratamiento con endo- $\beta$ -1,4-xilanasa resultó en un IP mayor (3,48), el cual sigue siendo menor el IP hallado en nuestro trabajo para el AX 3.

#### 1.4. Correlaciones entre la caracterización de los extractos y su efecto prebiótico

Se observó una correlación negativa entre la relación ara/xil y el CR y AP de *L. reuteri*, lo cual habla de un mayor desarrollo de este probiótico cuando mayor es la cantidad de xilosa que tiene el extracto, es decir, menor es la ramificación del arabinoxilano y su grado de sustitución (Saulnier *et al.* 2007).

*L. reuteri* produce reuterina, un antimicrobiano que protege de los agentes patógenos y tiene un efecto prebiótico antiinflamatorio que produce histamina (Cadieux *et al.* 2008). Además, ha demostrado la capacidad de reducir la incidencia de enterocolitis necrosante en un 50% en un modelo animal bien definido (Navarro *et al.* 2017). Por lo tanto, la mayor AP de *Lactobacillus* frente a moléculas con menor relación ara/xil, es un dato importante a tener en cuenta al pensar en posibles modulaciones del microbioma intestinal.

A su vez, se observó una correlación negativa entre CR y AP de *C. perfringens* y *B. breve* (Tabla 18). Este resultado indicaría una posible modulación del microbioma intestinal, en donde el aumento del crecimiento de una cepa probiótica como *B. breve* frente a los AX como compuesto prebiótico, disminuiría el desarrollo de bacterias intestinales no asociadas a beneficios saludables como es el caso de *Cl. perfringens* (Fukuda *et al.* 2011).

Tabla 18. Correlaciones entre el efecto prebiótico analizado y la composición del extracto de los AXs.

	PI	CR CI	CR Bac	CR Lb	CR Bif	AP CI	AP Bac	AP Lb	AP Bif	Xil	Ara	Glu	Ara/xil
PI	1												
CR CI	ns	1											
CR Bac	ns	Ns	1										
CR Lb	ns	Ns	ns	1									
CR Bif	ns	<b>-0,83**</b>	ns	ns	1								
AP CI	ns	0,96**	ns	ns	-0,90**	1							
AP Bac	ns	Ns	0,97**	ns	ns	ns	1						
AP Lb	ns	Ns	ns	0,98**	ns	ns	ns	1					
AP Bif	ns	<b>-0,89**</b>	ns	ns	0,98**	-0,91**	ns	ns	1				
Xil	<b>0,71**</b>	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1			
Ara	ns	Ns	<b>-0,72*</b>	ns	ns	ns	-0,71*	ns	ns	0,78*	1		
Glu	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1	
Ara/xil	ns	Ns	ns	<b>-0,73*</b>	ns	ns	ns	<b>-0,74*</b>	ns	ns	0,74*	ns	1

Correlaciones de Pearson. (\*) indica una correlación con un  $p < 0,05$  y (\*\*) con un  $p < 0,01$ . ns indica que no se halló correlación entre los parámetros analizados.

El AX obtenido de variedades de trigo duro ha demostrado que promueve de manera eficiente el crecimiento de *Bifidobacterium breve* y *Lactobacillus reuteri*, que son cepas probióticas del intestino. Estos extractos, también mostraron, según el perfil de tamaño molecular, que tiene también moléculas de mayor tamaño que en el caso de los trigos blandos, pero aún así el mayor porcentaje de la distribución del TM arrojó un valor medio menor. Estas diferencias pueden deberse a distintos tipos de enlace entre la arabinosa y xilosa en los arabinoxilanos de los trigos duros y los blandos, y a las variaciones que los distintos tipos de trigo muestran en cuanto a su sustitución con ácido ferúlico (Saulnier *et al.* 2007; Malunga y Beta, 2015). Se ha reportado que el trigo blando tiene alto contenido de ácido ferúlico en comparación con el trigo duro (Ragae *et al.* 2006) y Ragae *et al.* (2011) han encontrado correlación positiva de *bifidobacterias* y *lactobacilos* con el contenido de ácido ferúlico en los AX, y negativas de los mismos con *Clostridium*, al igual que Gong *et al.* (2018). Esto podría explicar, también, las diferencias encontradas entre los resultados de los extractos obtenidos de los distintos tipos de trigo.

## 2. EVALUACION DE LOS EXTRACTOS DE AXs DE TRIGO DURO Y BLANDO

Se evaluó, también, el crecimiento relativo, actividad prebiótica e índice prebiótico de los dos extractos obtenidos cada uno de un pool de cada tipo de trigo bajo las mismas condiciones que los extractos evaluados anteriormente (AX b y AX d). Estos extractos se obtuvieron para llevar a cabo el ensayo *in vivo* en un modelo murino, pero se evaluó también su desempeño como prebióticos *in vitro* para después establecer las correlaciones entre ambas técnicas (*in vitro* e *in vivo*). Los datos obtenidos se exponen en la tabla 19. Ambos extractos mostraron IP similares al de la inulina y a los valores arrojados por AX 2 y AX 4 previamente evaluados (Figura 10).

Tabla 19. CR, AP e IP de los extractos de trigo duro y blando.

	Inulina	AX b	AX d
CR Lb	0,99 a	1,27 c	1,04 b
AP Lb	0,08 a	0,51 c	0,34 b
CR Bif	1,47 a	1,70 b	1,68 b
AP Bif	0,65 a	0,94 b	0,98 b
CR Bac	1,28 a	1,68 b	1,70 b
AP Bac	0,46 a	0,91 b	1,00 b
CR Cl	0,99 a	0,81 b	0,32 a
AP Cl	0,17 c	0,05 b	-0,38 a
IP	2,58 a	2,66 a	2,96 a

Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

Tanto AX d como AX b mostraron valores de CR mayores a 1, e incluso mayores que la inulina para ambos probióticos evaluados. Las AP de estas dos cepas (*L. reuteri* y *B. breve*) también fueron positivas, siendo los valores de *bifidobacteria* considerablemente mayores a los encontrados con los extractos evaluados anteriormente. El AX b mostró diferencias significativas en cuando al CR y AP de *L. reuteri*, mostrando un mayor crecimiento y actividad del probiótico en este extracto. A su vez, mostró un mayor desarrollo en el caso de *Cl. perfringes*. Cabe destacar que, la AP y el CR de esta cepa fueron significativamente menores a los encontrados con los extractos analizados anteriormente, haciendo referencia a un menor desarrollo de posibles patógenos oportunistas, y por ende mayor actividad prebiótica de los extractos evaluados. En el caso de *B. fragilis*, tanto CR y AP fueron altos, debido a la gran capacidad de la bacteria

para metabolizar estos arabinoxilanos (De Filippo *et al.* 2010). El IP hallado para el extracto de trigo duro fue el mayor de todos, aunque no mostró diferencias significativas con el extracto de trigo blando, ni con el control positivo.

El crecimiento relativo y actividad prebiótica de *L. reuteri* y de *Cl. perfringens* fue significativamente mayor para el caso del extracto de trigo blando, los cuales no contienen los polímeros de mayor TM (pico 1), que se observa en AX d. Sin embargo, el índice prebiótico obtenido fue mayor para los trigos duros.

Diferentes fibras dietéticas muestran impactos de fermentación bastante diferentes en las bacterias intestinales. Por ejemplo, las *bifidobacterias* y los *lactobacilos* no pueden fermentar los  $\beta$ -glucanos de cereales *in vitro*, pero sí pueden utilizar oligosacáridos resultantes de su hidrólisis parcial (Crittenden *et al.* 2002). *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium adolescentis*, en cambio, pueden fermentar arabinoxilanos de cadena larga *in vitro* a partir de una variedad de cereales sin prehidrólisis, mientras que estos sustratos no pueden ser fermentados por bacterias potencialmente dañinas como *E. coli*, *C. perfringens* o *C. difficile* (Oikarinen *et al.* 2007), como también se observó en este trabajo (AP y CR de *Clostridium*). Esto sugiere que diferentes fibras son más efectivas que otras para modular diferentes microbiomas.

Arabinoxilanos solubles de diferentes pesos moleculares y con distinto grado de entrecruzamiento puede afectar la selectividad hacia ciertos grupos bacterianos, como se observó en este trabajo. Lagaert *et al.* (2010) demostraron que *Bifidobacterium adolescentis* posee varias arabinofuranosidasas capaces de hidrolizar arabinoxilanos y Shin *et al.* (2003 a; 2003b) han caracterizado una  $\beta$ -xilosidasa y una arabinofuranosidasa en *Bifidobacterium breve*, la cepa utilizada en este ensayo. Además, se han estudiado arabinofuranosidasas de dos cepas de *Bifidobacterium Longum* (Margolles *et al.* 2003) así como las enzimas de *Bifidobacterium adolescentis* que liberan exo-oligoxilanasas (Lagaert *et al.* 2007), dos  $\beta$ -xilosidasas y dos arabinofuranosidasas (Van Laere *et al.* 1999) que hidrolizan distintos tipos de residuos de arabinosa de la cadena de xilosa de los AX.

En estudios se ha informado que los AXs de trigo de 66 KDa al ser fermentados estimularon particularmente el crecimiento de *Lactobacillus* y *Eubacteria*, mientras que otras fracciones de AXs (278 y 354 KDa) solamente aumentaron las cantidades de *Eubacterias* (Hughes *et al.* 2007). Los AX que son fermentados *in vitro* más lentamente se correlacionan con un mayor aumento de *Bacteroides fragilis* (Hopkins *et al.* 2003).

En este trabajo, donde el tamaño molecular de la mayoría de los polímeros de los extractos se encuentra alrededor de los 30 KDa, demostramos que los AXs pueden ser metabolizados por *B. fragilis* y favorecer el desarrollo de *bifidobacterias* y *Lactobacillus*. Además, estos resultados confirman la eficacia de AX como potenciales prebióticos debido a que no estimulan el crecimiento de posibles patógenos como *Clostridium*, y si el de los probióticos evaluados. El IP de ambos extractos fue alto, pero a pesar de no observarse diferencias significativas fue mayor el de AX d obtenido del pool de harinas de grano entero de trigos duros cultivados en la Argentina. Las diferencias estructurales podrían explicar esta diferencia.

## *CAPÍTULO 4*

### *FERMENTACION IN VITRO DE LOS AXs EN HECES HUMANAS*



El efecto prebiótico *in vitro* evalúa la capacidad de metabolizar a los AXs de distintos cultivos puros de cepas bacterias. En el microbioma intestinal las bacterias no sólo se encuentran con el compuesto prebiótico, sino que también interactúan entre las distintas cepas, pudiendo incluso observarse simbiosis o competencia entre ellas, y dando resultados diferentes a los que muestran en los cultivos puros.

Se realizaron fermentaciones de los AXs (Ax d y AX b), utilizando una vez más inulina como control positivo y sin el agregado de ningún compuesto en el caso del control negativo, con un inóculo obtenido a partir de heces humanas de personas sanas. El sistema que se evaluó, por lo tanto, fue un reflejo *in vitro* de la forma en que el microbioma completo interactúa con los arabinosilanos solubles en un ambiente que intenta reproducir de la manera más fiel posible, la del intestino humano.

La figura 11 muestra la variación de la presión y el pH en función del tiempo hasta las 28 h de fermentación.

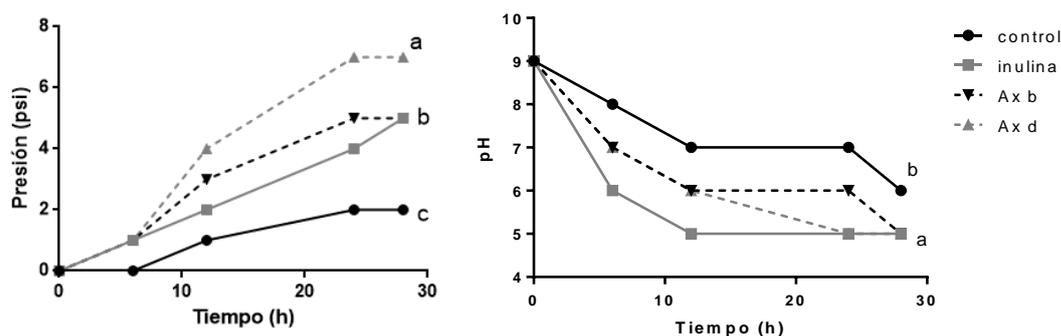


Figura 11. Variación de la presión y pH durante las 28 h del ensayo de fermentación. Distintas letras indican diferencias significativas a las 28 h con un  $p < 0,05$ .

La presión aumentó de manera significativamente mayor durante la fermentación, tanto en el control positivo, como en los fermentos que contenían ambos extractos de arabinosilanos. El AX d, sin embargo, fue el que mostró el mayor aumento de presión, incluso en comparación con la inulina. En cuanto al pH, en todos los casos fue disminuyendo, alcanzando a las 28 h un valor menor para el control positivo y los dos AXs en relación al control negativo, sin haber diferencias significativas entre los valores hallados entre ellos. El control negativo tuvo un valor final de pH de 6,2, mientras que los fermentos con AXs e inulina alcanzaron valores entre 5,1 y 5,3.

Los principales productos finales que se obtienen de las fermentaciones colónicas son ácidos grasos de cadena corta, gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, y H<sub>2</sub>) y calor (Topping y Clifton, 2001). La caída en el pH colónico es causada por la acumulación de AGCC que disminuyen la solubilidad de los ácidos biliares libres, que puede disminuir la actividad promotora del desarrollo de tumores potenciales que presentan los ácidos biliares secundarios (Grubben *et al.* 2001). *Bacteroides cellulosilyticus*, también tiene la fuerte capacidad de descomponer fibras dietarias (Robert *et al.* 2003; Roberts *et al.* 2015), produciendo AGCC y reduciendo el pH en el colon. La disminución del pH, por ende, no sólo demostraría la capacidad del microbioma del inóculo de metabolizar los AXs generando AGCC, si no que generaría en el intestino los efectos beneficiosos enumerados anteriormente, además de ejercer un efecto protector de ciertos patógenos oportunistas debido a la acidificación.

#### 1.1. Concentraciones finales de probióticos después de la fermentación

Al finalizar la fermentación se determinó la concentración de bacterias probióticas presentes en el inóculo de la materia fecal humana incubados con los prebióticos (AX b, AX d e inulina) y el control negativo. En ambos casos, tanto *Lactobacillus* como *Bifidobacterium* mostraron mayores concentraciones en los fermentos que contenían los arabinosilanos, al igual que los que contenían inulina. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ellos, salvo en el caso de la cantidad hallada de *bifidobacterias* en el fermento con el extracto de arabinosilano de trigo blando (figura 12), y de la inulina para el caso de *Lactobacillus*.

En un estudio previo, fibras dietéticas de composición química variable fueron reportadas como efectivas para estimular el crecimiento de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Roseburia* y *Parabacteroides* (Graf *et al.* 2015). Otros investigadores sugieren que el aumento de la ingesta de trigo integral se asocia con una mayor abundancia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en comparación con la ingesta de trigo refinado (Costabile *et al.* 2008; Rosa-Sibakov *et al.* 2015).

Gong *et al.* (2018) encontraron que después de la fermentación *in vitro* con heces humanas durante 24 h con harinas de trigos tanto integrales como refinadas aumentó la abundancia relativa de *cidaminococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Distintos cultivares de trigo tenían efectos desiguales sobre el microbioma, lo cual concuerda con

que el incremento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* fue diferente en ambos extractos que fueron extraídos de distintos cultivares y tipos de trigo en el presente estudio.

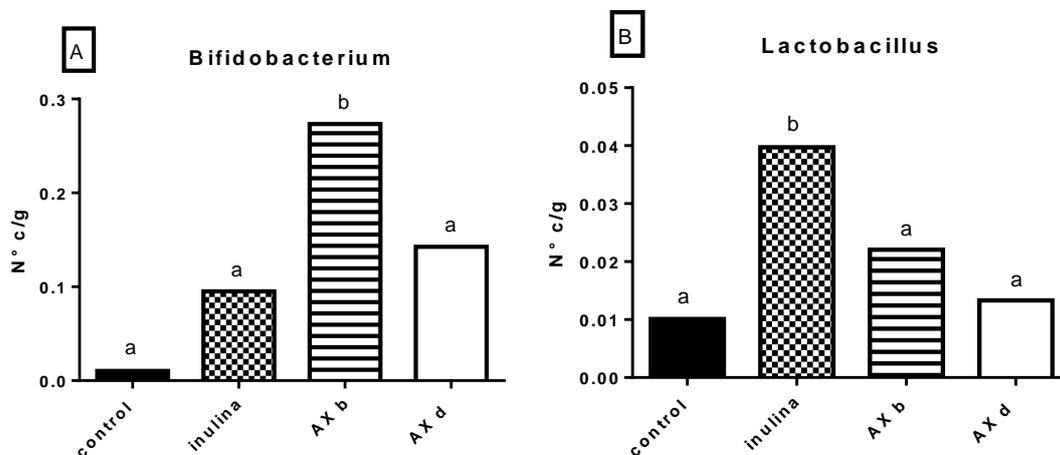


Figura 12. Cantidad de las cepas probióticas halladas al final de la fermentación. Número de copias de *Bifidobacterium* (A) y *Lactobacillus* (B) en el barro fecal al final del ensayo de fermentación. Distintas letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

### 1.2. Medición de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta

Se evaluó la variación de las concentraciones de AGCC en los distintos fermentos, ya que la disminución del pH y el aumento de la presión en este sistema se deberían principalmente a ellos. La producción de estos metabolitos está determinada por numerosos factores, incluyendo la cantidad y tipo de bacterias presente en el colon y la fuente de sustrato (Roberfroid *et al.* 2005).

Tanto el ácido acético, como el propiónico y el butírico fueron cuantificables desde el tiempo inicial de la fermentación, pudiendo evaluarse así la variación de los mismos durante todo el ensayo. Para el caso de los ácidos isovalérico, isobutírico e isocáprico, en cambio, las concentraciones iniciales se encontraron debajo de los límites de cuantificación del equipo, permitiendo sólo su cuantificación a partir de las 12 o 24 h. Es por esto, que se analizaron solamente las concentraciones finales de los mismos (figura 13).

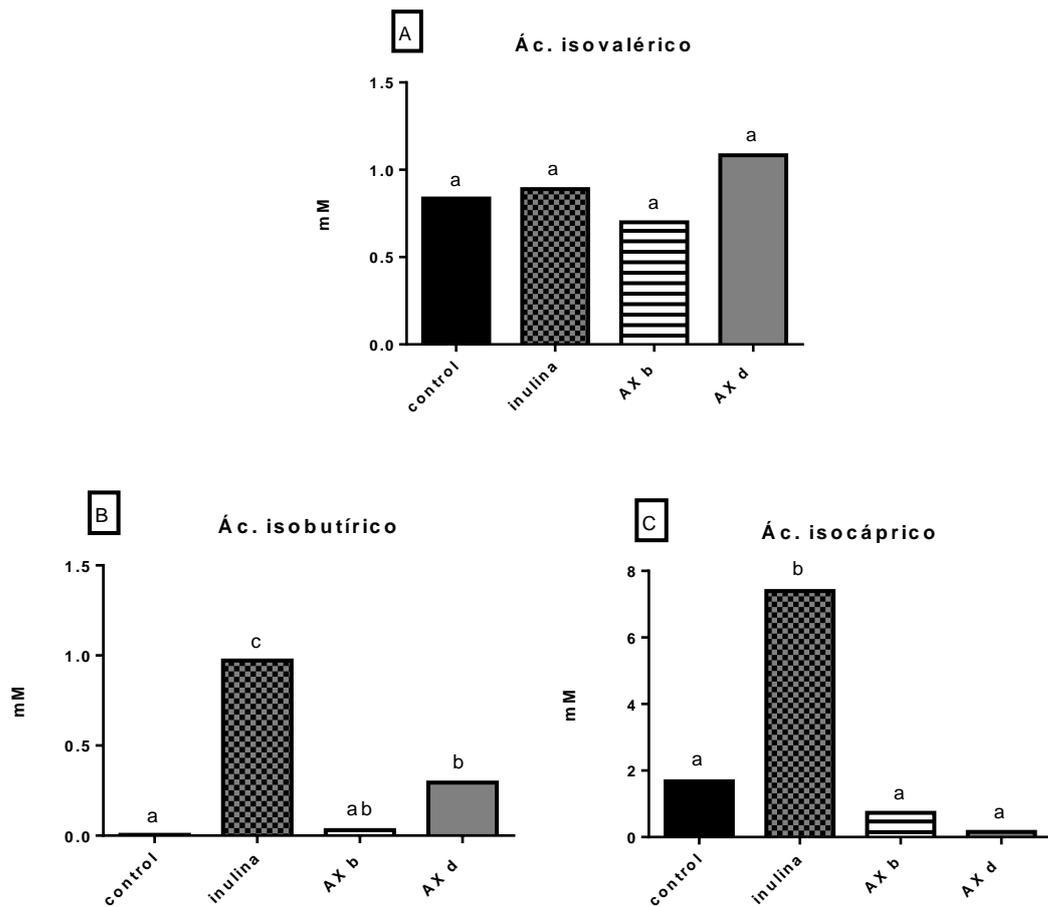


Figura 13. Concentraciones de los AGCC halladas a las 28 h de la fermentación. Ácido isovalérico (A), isobutírico (B) e isocáprico (C). Distintas letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

Se observó una concentración significativamente mayor de ácido isobutírico para los fermentos con extractos de arabinosilanos, siendo todavía mayor para el caso del extracto obtenido a partir del trigo duro. Aún así, ninguno de los AX mostró un aumento como el producido en la fermentación con inulina. Las concentraciones de ácido isovalérico e isocáprico al finalizar la fermentación no mostraron diferencias significativas entre aquellas llevadas a cabo con los extractos de AXs y el control negativo. En el caso del isovalérico, tampoco se observaron diferencias entre los valores obtenidos para el control positivo y el negativo.

Gong *et al.* (2018) también informó que se detectaron ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y ácido láctico en la fermentación *in vitro* de harinas integrales de trigo, pero no encontraron ácido valérico.

El ácido acético fue el AGCC dominante, y mostró diferencias significativas entre diferentes tipos de trigo.

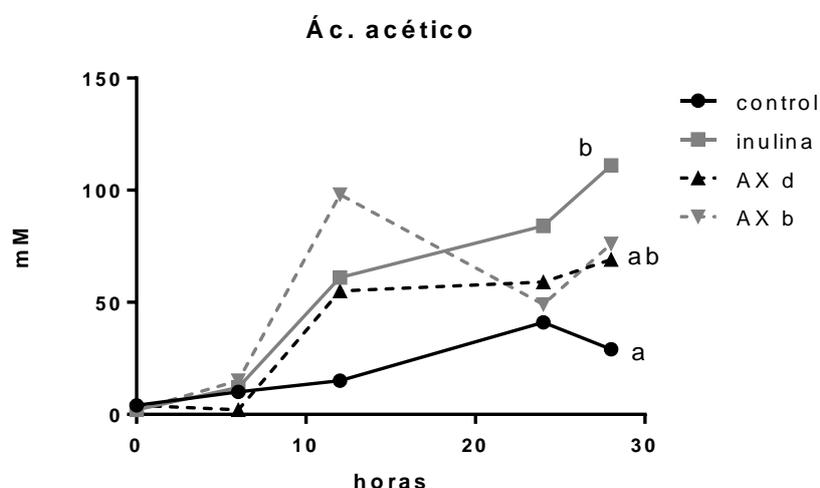


Figura 14. Variación de la concentración de ácido acético durante la fermentación. Distintas letras indican diferencias significativas en las concentraciones finales con un  $p < 0,05$ .

De acuerdo a los resultados de este estudio, el ácido acético fue el que mayor concentración final mostró. Aumentó durante todo el período de fermentación, a excepción del AX blando que mostro la mayor concentración a las 12 h, observándose luego una disminución de la concentración al finalizar el ensayo. Esto podría deberse a que la fermentación de AX b fue más rápida que la de AX d. Aún así, tanto la fermentación con AX duro como con AX blando mostraron cantidades significativamente mayores de C: 2 en relación con el control negativo. Rumpagaporn *et al.* (2015) también encontraron que el ácido graso que se producía en mayor cantidad durante la fermentación *in vitro* de AX era el acético, siendo el primero en aumentar, y aquel que terminaba con mayor concentración final.

Hasta las 24 h de la fermentación, ninguno de los fermentos mostró un aumento importante en la concentración del ácido butírico, sin embargo, a las 28 h, los valores del C:4 fueron significativamente superiores para el caso del AX duro, junto con el control positivo, en relación con el control negativo y el AX blando. Este comportamiento podría explicar el hecho de que el AX duro haya finalizado el proceso de fermentación con una presión mayor a la observada en el fermento del AX b, ya que los AGCC aportan al aumento de la misma y la diferencia de la concentración de este ácido en particular entre los dos extractos fue importante.

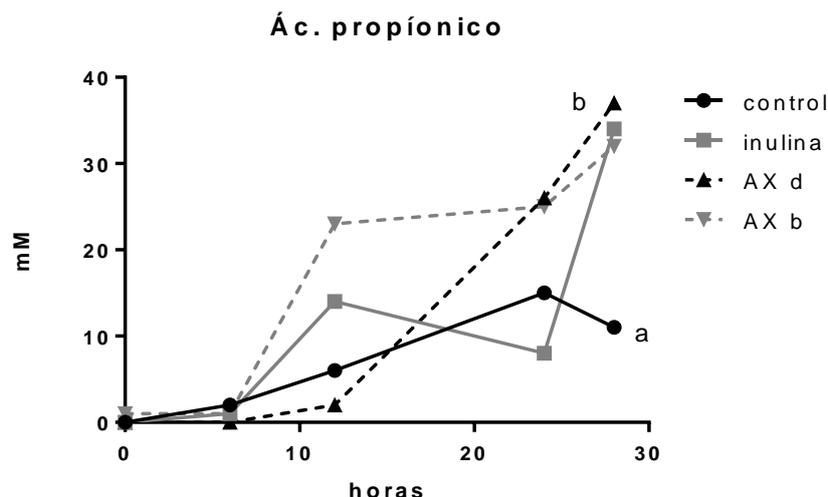


Figura 15. Variación de la concentración de ácido propiónico durante la fermentación. Distintas letras indican diferencias significativas en las concentraciones finales con un  $p < 0,05$ .

Se sabe que la fermentación de arabinosilanos produce cantidades de propionato relativamente altas (Glei *et al.* 2006; Rose *et al.* 2010; Van Laar *et al.* 2002). En este trabajo, el ácido propiónico también aumentó durante todo el ensayo, observándose concentraciones significativamente más altas para los fermentos de ambos extractos de AXs evaluados al compararlo con el control negativo. Se advirtió que a las 12 h el AX d tuvo una concentración incluso menor a la del control negativo, mostrando una subida abrupta de la cantidad del ácido a partir de ese tiempo, y que en ese mismo tiempo las concentraciones de propiónico en el fermento con AX b fue la más alta de todas, y su aumento fue de manera más constante. Esto hace referencia a una velocidad o capacidad de fermentación diferencial del microbioma del intestino humano frente a cada extracto. Rumpagaporn *et al.* (2015) también observó que el propiónico incrementaba durante la fermentación de AX, que mostraron una producción relativamente alta, pero menor que para el caso del acético.

Un incremento en la producción de AGCC, específicamente butirato, puede resultar en un efecto protector en el colon distal (Wong *et al.* 2006). El butirato es el combustible preferido de las células epiteliales del colon, pero también juega un papel importante en la regulación de proliferación y diferenciación celular (Topping y Clifton, 2001; Roberfroid *et al.* 2005). Es el más importante en el metabolismo de los colonocitos, donde del 70 al 90 % de butirato es metabolizado por estos. Aunque la fermentación de los arabinosilanos generó una cantidad menor de butirato respecto a los otros AGCC (figura 16), se considera que este compuesto es butirogénico (Rycroft *et al.* 2001).

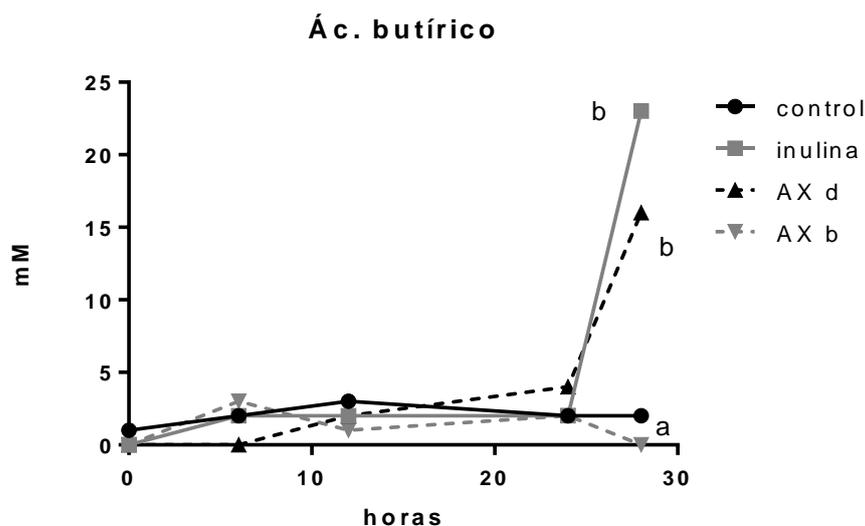


Figura 16. Variación de la concentración de ácido butírico durante la fermentación. Distintas letras indican diferencias significativas en las concentraciones finales con un  $p < 0,05$ .

La diferencia en la velocidad de fermentación entre los extractos, la cual también se destacó con los otros ácidos, podría deberse a la variación en el tamaño molecular y estructura de los mismos. El AX d presentó una distribución de tamaño molecular con un porcentaje de moléculas mayores que no se halló en el de trigo blando. Hughes *et al.* (2007) en experimentos de fermentación *in vitro* por lotes, observó mayores concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico tras la adición de fracciones de AX de masa molecular alta.

### 1.3. Variación del tamaño molecular de los AX durante la fermentación

La metabolización de los AXs por las bacterias intestinales humanas con las cuales fueron inoculadas las fermentaciones se comprobó al observar la disminución del tamaño molecular de estos compuestos a medida que pasaba el tiempo de fermentación e iba aumentando la presión y disminuyendo el pH. Los resultados se muestran en las figuras 17 y 18.

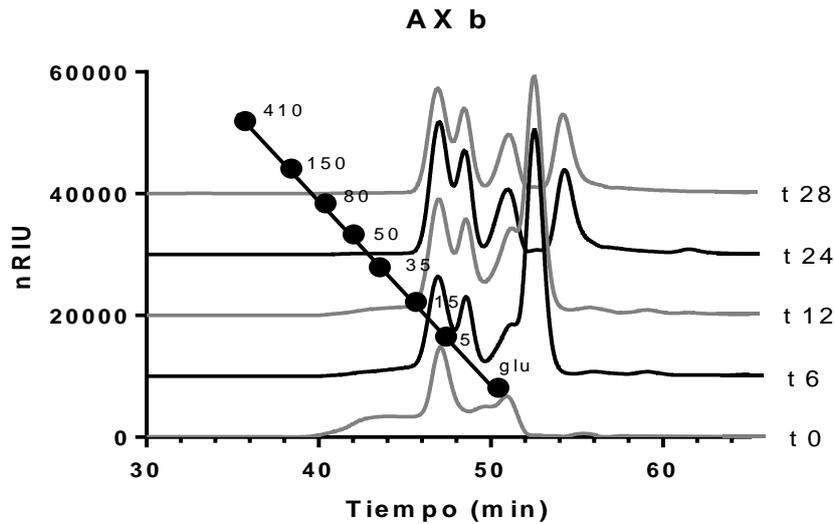


Figura 17. Variación del tamaño molecular del extracto de AX de trigo blando durante la fermentación.

En el caso del AX b, el primer pico donde se encuentra el porcentaje de moléculas que corresponde a un tamaño molecular entre 100 y 20 KDa encontrado al iniciar la fermentación (t 0) disminuyó de manera notable a las 6 h, pero hasta el t 12 se siguieron observando algunas moléculas de ese TM. A las 6 h de fermentación también se observó un pico a los 48,7 min de moléculas de aproximadamente 3 KDa que no se visualizaron al iniciar la fermentación, otro muy importante de 0,5 KDa (52,5 min), así como otros menores que eluyeron después de los 57,0 min (menor TM). Pasadas las 12 h del ensayo, se enfatizó el número de moléculas de alrededor de 5 KDa (47,0 min), y a las 24 h se observó una importante cantidad de moléculas de 0,21 KDa a los 54,5 min que se mantuvieron hasta finalizar el experimento.

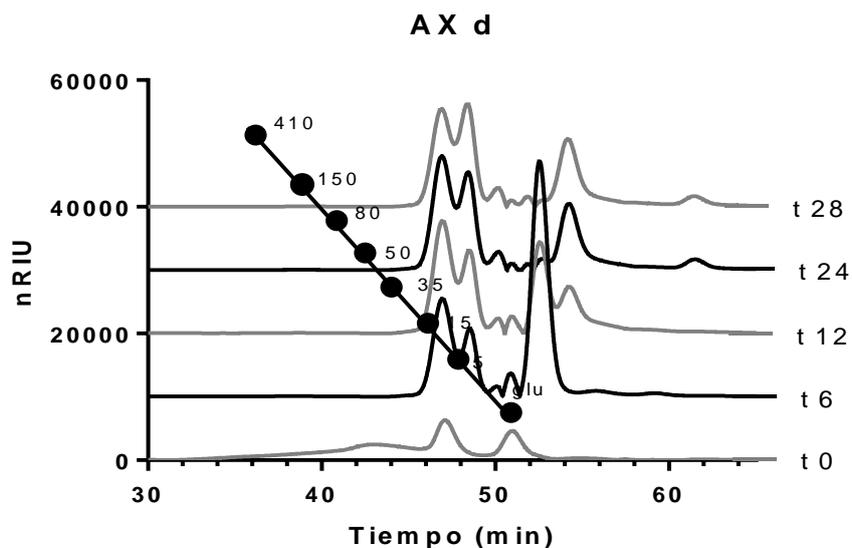


Figura 18. Variación del tamaño molecular del extracto de AX de trigo duro durante la fermentación.

Los AX de trigo duro, como se detalló anteriormente, mostraron dos picos de alto TM a diferencia del blando. Al iniciar este ensayo (t 0) uno eluyó a las 39,0 y el otro a los 41.0 min, que en esta representación no logran verse con precisión por la escala, pero son detectados en el ensayo. Ambos desaparecieron completamente a las 6 h de la fermentación, indicando que los compuestos de alto peso molecular pudieron ser hidrolizados eficientemente. De la misma manera que con AX b, en el tiempo 6 aumentó la proporción de los picos correspondientes a 5 KDa (47,0 min) y 1 KDa (51,0 min), aproximadamente. Estos aún se observaron a las 12 h y decrecieron significativamente en los tiempos 24 y 28 h. A partir de las 12 h de fermentación comenzó a incrementarse la cantidad de moléculas que eluyeron a los 53,0 min (0,4 KDa), y 24 h después moléculas de tiempo de retención de 61,5 min (0,10 KDa), que se encontraron también al finalizar la fermentación (t 28).

Como pudo observarse en ambos casos, el tamaño molecular de los dos extractos de AX fue disminuyendo a medida que era mayor el tiempo de fermentación (mayor tiempo de retención, menor tamaño molecular). La distribución de TM tanto de AX b como de AX d, en los tiempos 24 y 28 h fueron iguales, confirmando que a las 24 h ya se había completado con la fermentación de los AX, y ya a las 6 h se observaron cambios importantes en el tamaño de los mismos.

El perfil de hidrolisis de ambos extractos fue, como se observa, similar. Sin embargo, en la figura 19 se muestran superpuestos los perfiles encontrados para los dos extractos al mismo tiempo de fermentación.

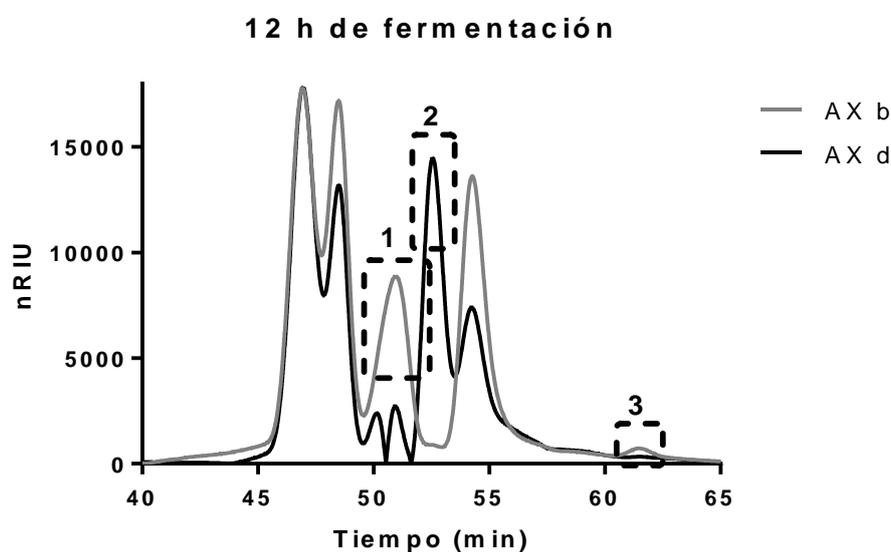


Figura 19. Diferencias en el perfil de tamaño molecular de los extractos de trigo duro y blando a las 12 h de la fermentación. Los recuadros con sus respectivos números marcan los picos distintos hallados. El pico 1 y 3 corresponden al AX b y el pico 2 al AX d.

Se hallaron tres picos distintos, el pico 1 que eluyó a los 52.0 min correspondiente al AX b de mayor tamaño molecular que el pico 2 de tiempo de retención de 54.5 min del AX d, ambos en un importante porcentaje de moléculas, y el pico 3 (62.3 min) de un TM significativamente menor al resto de los picos correspondiendo sólo al extracto de trigo blando (0,10 KDa). A las 24 h de fermentación se encontraron las mismas diferencias. Esto nos permite, una vez más, pensar en los distintos tipos de enlace presentes en las cadenas de xilosa y sus sustituyentes en los diferentes tipos de trigo, y, por lo tanto, capacidades desiguales de hidrólisis por parte de las bacterias intestinales humanas. Es importante resaltar que las moléculas de altos TM encontradas en el extracto de trigo duro fueron rápidamente fermentadas por las bacterias del microbioma humano.

Hughes *et al.* (2007), quien fermentó AX de trigo de diferente peso molecular (PM), utilizando heces fecales humanas al igual que en este ensayo, informó que todas las fracciones de AX mostraron impacto bifidogénico comparables, pero que los AX de menor PM (66 kDa) fueron particularmente selectivos para *Lactobacillus* y *Eubacterium*. Informo también que las fracciones de alta masa molecular de AX (con masas moleculares entre 354 y 66 kDa) aumentaron significativamente los recuentos de

*bifidobacterias*, y afirmaron que el efecto bifidogénico fue claramente mayor a medida que la masa molecular decrecía.

La estructura química de los AX puede influir en la fermentación y el crecimiento selectivo o en la actividad de bacterias intestinales benéficas. Las diferencias encontradas en este trabajo podrían deberse no sólo al tamaño molecular de los extractos, sino también a los tipos de enlaces que se encuentran en ellos. Esto mismo podría explicar las diferencias en cuanto al rendimiento y velocidad de las fermentaciones que se encontraron entre los extractos AX d y AX b, siendo más efectiva la correspondiente al trigo duro. Este sólo aumento la cantidad de bacterias probióticas, si no que fue el que produjo mayores cantidades de AGCC, así como mayor aumento de presión y disminución del pH. Ambos extractos mostraron distintos tamaños moleculares, pero no se hallaron diferencias significativas entre sus índices de ara/xil. Todas las moléculas de mayor TM del AX d fueron completamente metabolizadas por el microbioma humano.



## *CAPÍTULO 5*

### *EFEECTO PREBIOTICO IN VIVO*



Numerosos estudios han demostrado que la dieta es un elemento importante y fundamental en la diversidad bacteriana intestinal y uno de los compuestos más prometedores para manipular la composición del microbioma intestinal son las fibras dietéticas (Ley *et al.* 2006; Santacruz *et al.* 2009; Duncan *et al.* 2008).

Habiendo confirmado que los AXs de trigos duros y blandos tienen efecto prebiótico *in vitro*, se procedió a realizar la evaluación del efecto de los extractos *in vivo*. La modulación de la flora intestinal de las ratas o ratones dan una representación de la situación en el colon humano, aunque la fisiología intestinal no es la misma (Gibson y Fuller, 2000).

Los animales fueron identificados de manera individual y separados en 4 grupos de la siguiente manera:

- Grupo Control negativo (alimento cooperación con agua)
- Grupo Control Positivo (alimento cooperación con Inulina)
- Grupo AX blando (alimento cooperación con extracto de AXs de trigo blando)
- Grupo AX duro (alimento cooperación con extracto de AXs de trigo duro)

Durante todo el ensayo tuvieron libre acceso a comida y agua, además del consumo del pellet con el tratamiento correspondiente. En la tabla 20 se muestra el promedio de la comida consumida por ratón durante el transcurso del experimento. Como puede observarse no hubo importantes variaciones en ninguno de los parámetros analizados entre los distintos grupos.

Tabla 20. Promedio de la variación de peso del animal e ingesta de comida por ratón de cada uno de los grupos.

grupo	[Pf-Pi]	mg/d/R	% peso
control	4,6	3,1	21,5
inulina	4,7	3,0	22,4
AX blando	4,7	2,9	23,2
AX duro	4,4	3,1	21,4

[Pf-Pi] es la diferencia entre el promedio del peso final e inicial de los ratones, mg/d/R es la cantidad de mg promedio que comió cada ratón por día, y % peso es el promedio del porcentaje del aumento de peso de los ratones por grupo.

Se graficó el promedio del aumento de peso de los ratones durante todo el tratamiento para los cuatro grupos. Los datos obtenidos se muestran en la figura 20. No se observaron diferencias significativas entre la variación del peso corporal de los grupos en ninguno de los casos, tanto con los extractos de arabinosilanos a evaluar, como en el caso del control negativo ni del control con inulina. Van Craeyveld *et al.* (2008) en un estudio *in vivo* con ratones alimentados con AXOS también encontró que los pesos corporales y la ingesta de alimento no difirieron entre los grupos.

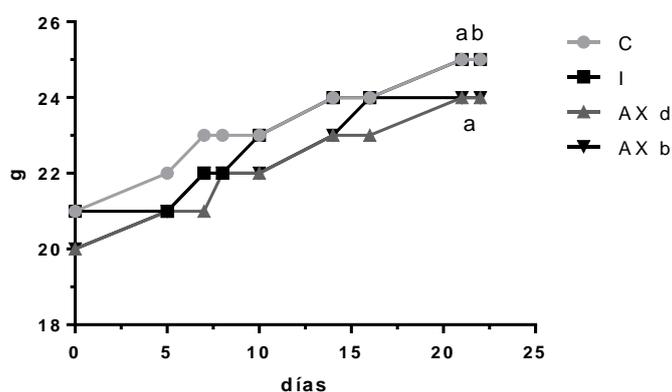


Figura 20. Variación del peso promedio en gramo de los ratones en de cada grupo durante el tratamiento.

#### 4.1. Análisis del perfil de microbioma

Se tomaron muestras de materia fecal de cada uno de los ratones de los 4 grupos antes de comenzar con la dieta, y al finalizar la misma. También se analizó el contenido cecal, obtenido al día siguiente de finalizado el tratamiento. Se evaluó el perfil del microbioma intestinal de los ratones, mediante cuantificación por qPCR de 5 grupos bacterianos representativos.

Las muestras evaluadas de la materia fecal de todos los ratones antes de comenzar con la dieta (t0) no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos (datos no mostrados). Para evaluar como varió la cantidad de las distintas cepas presentes en la materia fecal durante el tratamiento, se procedió a calcular las diferencias entre las concentraciones al principio y al final del mismo. Los resultados se muestran en la figura 21.

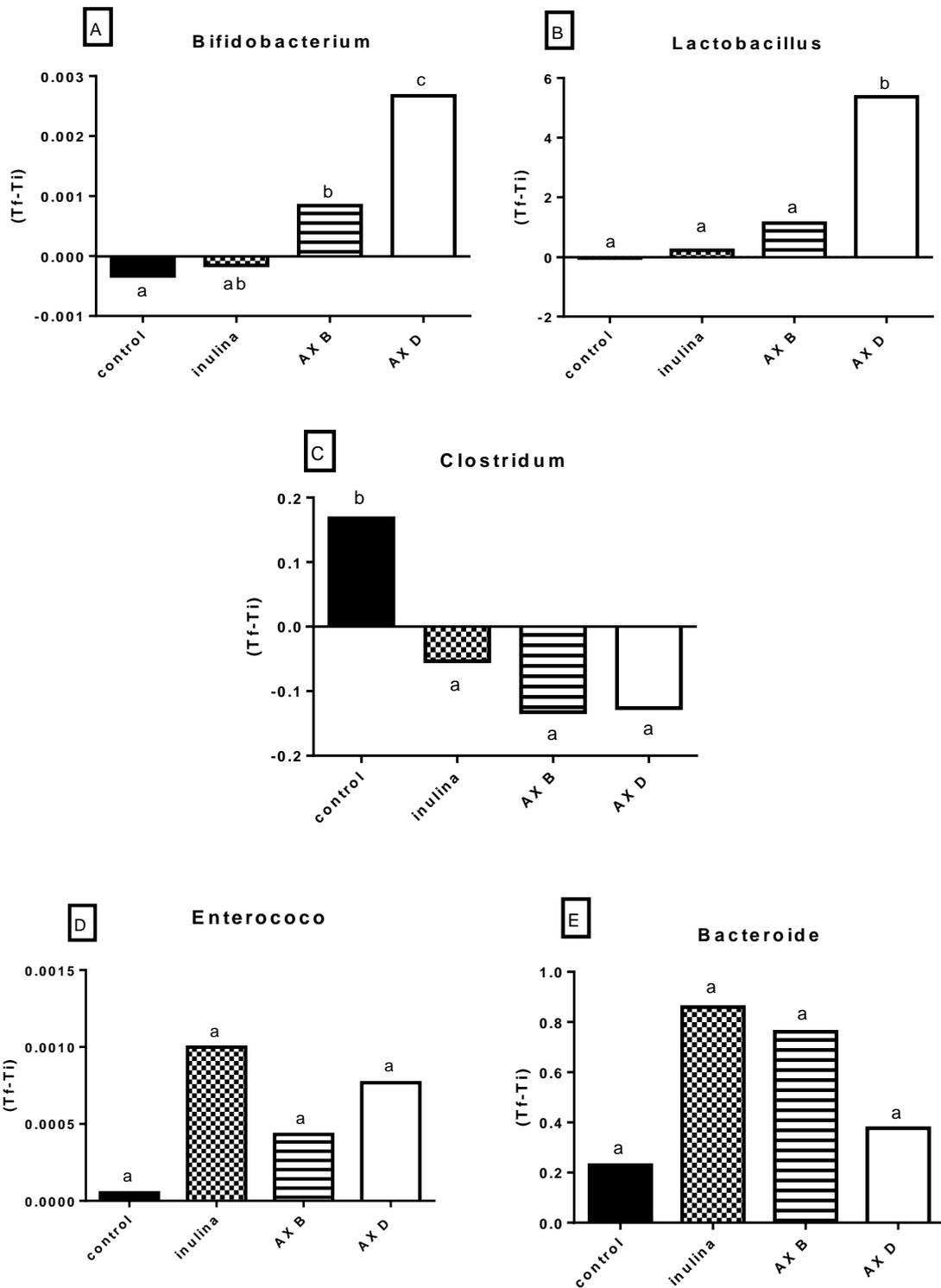


Figura 21. Diferencias entre la cantidad inicial y final de cada cepa bacteriana después del tratamiento. *Bifidobacterium* (A), *Lactobacillus* (B), *Clostridium* (C), *Enterococcus* (D) y *Bacteroides* (E). Distintas letras indican diferencias significativas entre los grupos con un  $p < 0,05$ . (Tf-Ti) refiere a la diferencia de las concentraciones halladas al final e inicio del ensayo.

Las distintas concentraciones de las cepas probióticas evaluadas mostraron aumentos en presencia de los AXs, siendo significativamente mayor el aumento para el caso de los AXs extraídos a partir del trigo duro, en concordancia con el resultado obtenido en los experimentos realizados *in vitro*. Este extracto (AX d) fue el que en su distribución de tamaño molecular mostró un pico de moléculas de mayor TM, el cual era inexistente en el caso del extracto de trigo blando. Sin embargo, el mayor porcentaje de moléculas tuvo un menor tamaño que en el trigo blando (capítulo 2, figura 9). En el caso del control negativo, se halló una disminución de la concentración para el caso de *Bifidobacterium*, y no se observó modificación en la concentración de *Lactobacillus*.

*Clostridium*, en cambio, tuvo un significativo aumento en el grupo de control negativo, mientras que, con los extractos y con inulina disminuyó la cantidad de esta cepa en el microbioma intestinal. *Bacteroides* y *Enterococcus* no mostraron variaciones significativas durante el tratamiento.

El aumento de las bacterias probióticas en el caso de los animales que consumieron los extractos de AXs, junto con la disminución de la cantidad de *Clostridium*, entre el inicio y el final del tratamiento, refieren a un efecto beneficioso de los AXs sobre su microbioma intestinal. Yang *et al.* (2012) también observó aumento de *Bifidobacterium* en comparación con el control y una reducción de *Clostridium* en fermentación con sustratos de fibra dietética.

Se analizó también el perfil del microbioma intestinal de las muestras de contenido cecal de los ratones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22. Se pudo observar que los animales que en su dieta incluyeron los extractos de arabinosilanos, mostraron diferencias significativas en relación con el control negativo, siendo en ambos casos, mayor el contenido tanto de *Bifidobacterium* como de *Lactobacillus*, al igual que en el caso de la inulina. Cabe destacar que, en ambos casos, fue el extracto de AXs de trigo blando el que mostró una cantidad final de ambas cepas significativamente mayor que la inulina, a pesar de que el aumento durante el tratamiento analizado en materia fecal haya sido mayor en el caso del AX d (figura 21).

Neyrinck *et al.* (2011), en su análisis cuantitativo en contenido cecal mostró que la suplementación con AXOS indujo un aumento del número de *bifidobacterias* en el contenido cecal. Sin embargo, el número de los *lactobacilos* disminuyeron con la dieta, mientras que el número de *Bacteroides -Prevotella spp.* no fue significativamente modificado por el tratamiento.

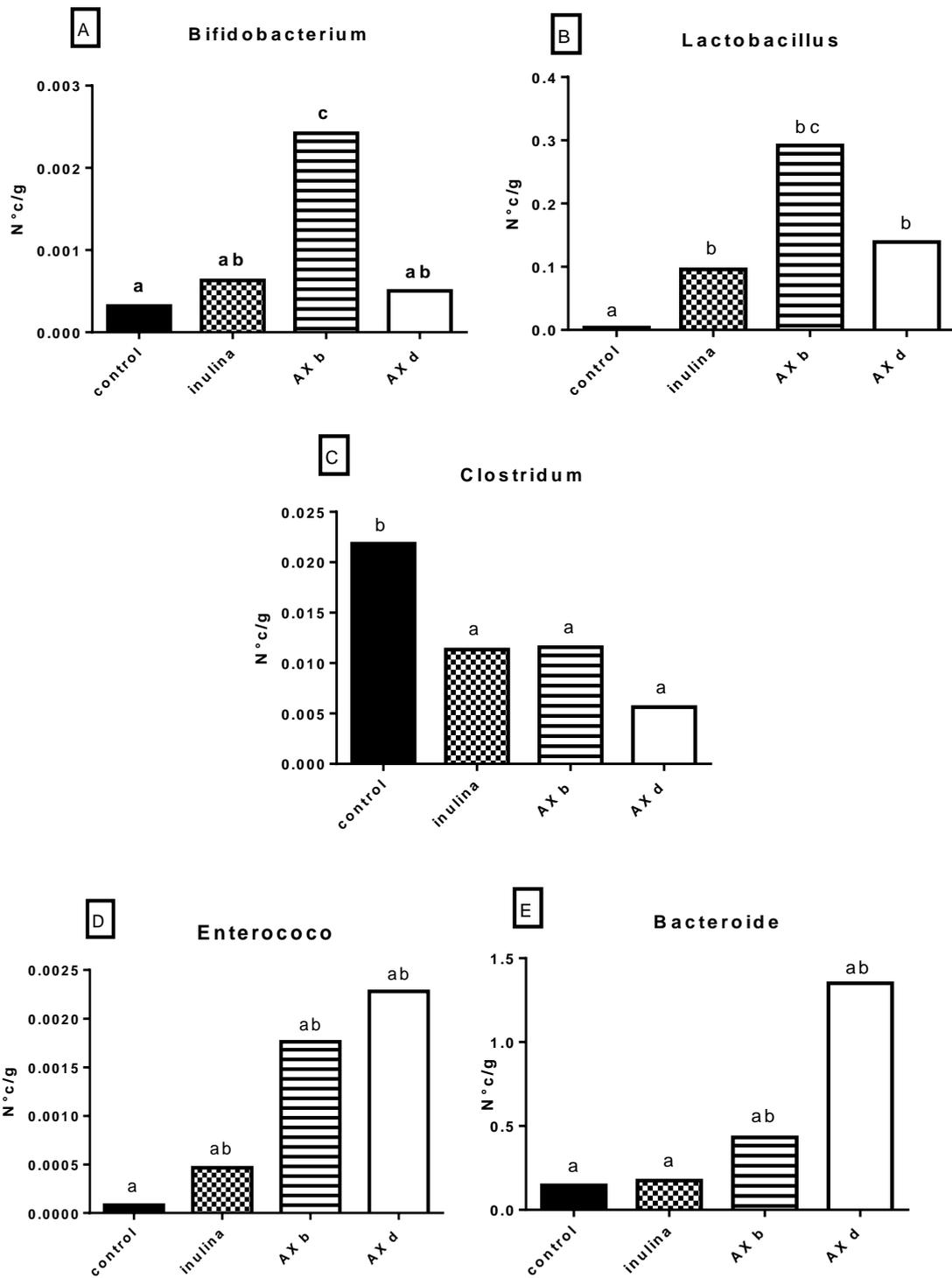


Figura 22. Número de copias por gramo de contenido cecal de las distintas cepas. *Bifidobacterium* (A), *Lactobacillus* (B), *Clostridium* (C), *Enterococcus* (D) y *Bacteroides* (E). Distintas letras indican diferencias significativas entre los grupos con un  $p < 0,05$ .

*Clostridium*, que es una cepa que no le aporta beneficios al huésped, y por el contrario suele aumentar en ciertas patologías intestinales, se halló en una concentración significativamente menor para el caso de aquellos grupos que ingirieron los extractos, y la inulina. Altas proporciones de esta bacteria se han relacionado con la propensión a la acumulación de las grasas en modelos de obesidad y la inflamación intestinal (de La Serre *et al.* 2012). Para el caso de *Bacteroides* y *Enterococcus*, se observó mayores cantidades en los ratones tratados con los extractos al finalizar el tratamiento en comparación con los controles.

El hecho de que, para ambas cepas probióticas analizadas, la cantidad final haya sido significativamente mayor para los animales que se alimentaron con el extracto de AXs de los trigos blandos concuerda con lo observado en los experimentos de fermentación *in vitro* (Tabla 21, capítulo 3). Sin embargo, la diferencia de aumento o disminución de las bacterias analizadas en el tiempo inicial y final en materia fecal, mostró que la modulación fue más eficiente para el caso del extracto de trigos duros (figura 21). Este extracto fue el que, como se mostró en el capítulo anterior, metabolizó de manera completa el pico de mayor TM (entre 400 y 50 KDa) en menos de 6 h en la fermentación *in vitro* (Capítulo 4, figura 18). El extracto de trigo blando, en cambio, en ese ensayo no logró degradar completamente las moléculas más grandes que este presentaba (entre 100 y 20 KDa) por el microbioma intestinal humano hasta después de las 12 h (Capítulo 4, figura 17). Esto indicaría, que además de sus diferencias en cuanto a TM, las velocidades de fermentación de los dos extractos son distintas.

Estas diferencias en la estructura, TM y velocidad de fermentación explicarían también las variaciones observadas en el perfil del microbioma intestinal de los ratones según el tipo de dieta que consumieron, con los arabinoxilanos de los distintos genotipos de trigo.

Se ha demostrado que las características estructurales de los arabinoxilanos conducen a diferentes patrones de degradación por parte de las bacterias colónicas. En un estudio Rumpagaporn *et al.* (2015) observaron que los AX de trigo y maíz que tenían una cantidad mayor de xilosa terminal eran fermentados más lentamente. También se informó que la fermentabilidad de los AX más altamente ramificados del salvado de trigo fue menor que la de uno ligeramente ramificado de células de aleurona (Amrein *et al.* 2003). Como en el presente trabajo la extracción de los AX fue realizada a partir de harinas de grano enteros, los análisis realizados cuantan no solo con los AXs de todas las capas del grano al mismo tiempo, a diferencia de todos los estudios realizados previamente.

#### 4.2. AGCC en el contenido cecal de los ratones

Se determinó la cantidad de los ácidos acético, propiónico y butírico en el contenido cecal de los ratones. La concentración de ácido acético fue significativamente mayor en los ratones que recibieron la dieta con inulina y con arabinoxilanos, tanto de trigos duros como blandos y fue el AGCC que se encontró en mayor concentración de todos los analizados (figura 23). Este resultado coincide con lo observado por Wong *et al.* (2006).

El mismo efecto se observó con el ácido butírico (figura 23) en los ratones alimentados con el extracto de AXs blando, incluso los niveles fueron mayores que los tratados con inulina además del control negativo. Esto podría explicarse debido a que, la cantidad final de *bifidobacterias* fue superior en el contenido cecal de los ratones que consumieron AX b, y es esta la cepa bacteriana a la cual se le atribuye la mayor capacidad de metabolizar este ácido.

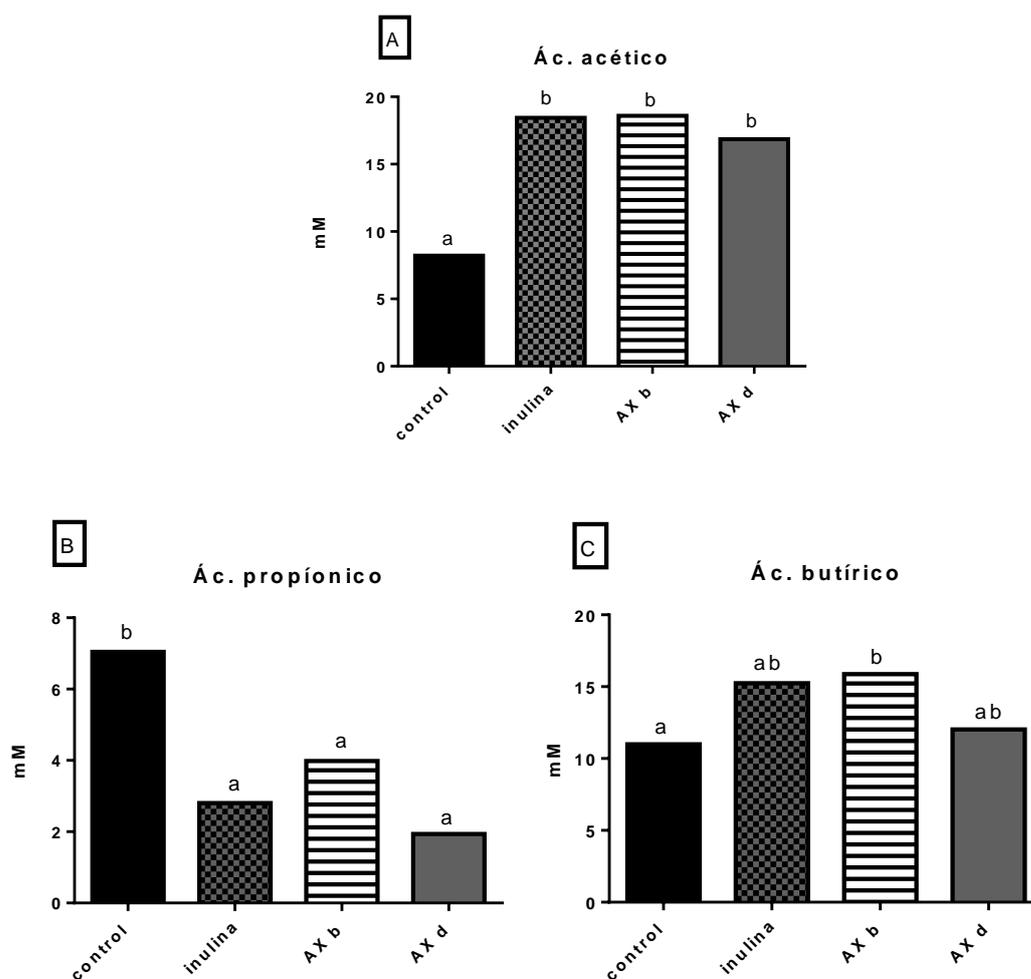


Figura 23. Concentraciones de ácido acético (A), propiónico (B) y butírico (C) en el contenido cecal de los ratones al finalizar el tratamiento con dieta. Distintas letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

El ácido propiónico fue el único que no arrojó los resultados esperados, ya que el grupo control presentó mayor concentración que todos los tratamientos (figura 23). Lopez *et al.* (1999) encontraron que los niveles de ácido propiónico se incrementaban cuando las ratas eran alimentadas con panes con un alto contenido de AXs. Un resultado similar fue reportado por Van den Abbeele *et al.* (2011), quienes inocularon ratones con microbiota fecal humana y observaron el efecto de la ingesta de AX de cadena larga.

Las observaciones clínicas recientes sugieren que ciertos factores intestinales y de la dieta pueden empeorar transitoriamente algunos trastornos generalizado del desarrollo con síntomas relacionados al autismo. El ácido propiónico es un intermediario importante del metabolismo de las células, y aunque tiene varios efectos biológicos beneficiosos, su acumulación es neurotóxica (El-Ansary *et al.* 2012). A pesar de que en su mayoría es acumulado en el intestino, el C:3 puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y acceder al sistema nervioso central. En el cerebro, puede atravesar las membranas celulares y acumularse dentro de las células, induciendo acidificación intracelular (Bonnet *et al.* 2000), que puede alterar la liberación de neurotransmisores, comunicación y comportamiento (Cannizzaro *et al.* 2003; Severson *et al.* 2003). MacFabe *et al.* (2007) mostró que la infusión intraventricular de ácido propiónico puede cambiar el comportamiento en ratas de laboratorio reproduciendo alteraciones similares a las manifestaciones del autismo humano. Se ha informado en distintos trabajos que el propionato fecal aumenta en los pacientes con Síndrome de Rett, así como en el ácido isobutírico e isovalérico (Borghetti *et al.* 2017).

#### 4.3. Relación entre el efecto prebiótico y la estructura de los AXs.

Debido a que la estructura de los oligosacáridos no digeribles influye en la velocidad y el grado de la fermentación intestinal, se puede suponer que su capacidad de modular el microbioma y los productos de fermentación que generan dependen, en gran medida, de su estructura. En general, los compuestos fácilmente fermentables son más exhaustivamente digeridos por las bacterias en el colon proximal (Vardakou *et al.* 2007), donde pueden aumentar la producción de AGCC y las concentraciones de *bifidobacterias*. La fermentación más lenta, en cambio, se produce más allá del colon proximal (Van de Wiele *et al.* 2007), donde pueden suprimir la fermentación de las proteínas cuyos metabolitos secundarios traen efectos perjudiciales para la salud.

A pesar de que en el ensayo *in vivo* llevado a cabo las diferencias encontradas entre los dos extractos no fueron tan marcadas, la distribución del tamaño molecular de los AXs

y el grado de polimerización probablemente distinto entre los dos tipos de trigo podría ser la razón de las diferencias encontradas en cuanto a contenido de *bifidobacterias* y la producción de butírico. En animales, específicamente en ratas, la administración de una dieta a base de pan rico en AXOS, con diferentes grados de polimerización y sustitución, mostró que los AXOS con bajo grado de polimerización promovieron un incremento en la producción de acetato y butirato en el colon y un aumento rápido en la concentración de la población bacteriana de *Bifidobacterium* spp. en el ciego. En contraste, la suministración de AXOS con alto grado de polimerización no aumentó la concentración de butirato ni estimuló el desarrollo de este grupo bacteriano (Van den Abbeele *et al.* 2011).

La evaluación *in vivo* de AXOS estructuralmente diferentes, muestra que la estructura tiene una fuerte influencia en el potencial prebiótico y los productos de fermentación formados (Van Craeyveld *et al.* 2008). En general, los AXOS más pequeños dan como resultado mayores incrementos en la respuesta inflamatoria intestinal, concentraciones de butirato y efecto bifidogénico significativo. Los compuestos más grandes conducen principalmente a la formación de AGCC en bajas concentraciones y que la influencia de la relación ara/xil parecía ser limitada. Van Craeyveld *et al.* (2008) sugiere que el AX no hidrolizado con alto índice ara/xil (mayor a 1) tiene una estructura que es muy resistente a la hidrólisis y fermentación, por lo que permanece no utilizado por el microbioma colónico (Karppinen *et al.* 2001). Los extractos de este estudio tienen, ambos, relaciones ara/xil menores a 1, y no mostraron diferencias significativas entre ellos.

#### 4.3. Correlaciones entre AGCC, estructura de los AXs y perfil del microbioma

Como era de esperar se observó una correlación positiva entre la concentración final de los metabolitos de las cepas probióticas (AGCC) y la cantidad de estas bacterias que se encontraron al final del ensayo. A su vez, se observó una correlación negativa entre algunas de las cepas que no son probióticas, como *Enterococcus* y *Bacteroides*, y la concentración de los AGCC (Tabla 21).

Borghi *et al.*, (2017) informaron correlaciones negativas entre la concentración de AGCC y la cantidad de *Bacteroides* que encontraron en el perfil del microbioma. Gong *et al.* (2018), encontraron correlaciones positivas entre *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y los ácidos grasos, sumado a una correlación negativa de los mismos y *Clostridium*.

Tabla 21. Correlaciones entre la composición físico-química de los extractos, la concentración de AGCC y de las distintas cepas bacterianas analizadas.

	Bif	Lb	Bac	Enco	C:3
Lb	Ns	1,00			
Clo	Ns	ns			
Bac	-0,99**	-0,99**	1,00		
Enco	-0,99**	-0,99**	ns	1,00	
C:2	0,99**	0,99**	-0,99**	-0,99**	
C:3	0,95*	0,95*	-0,95*	-0,95*	1,00
C:4	0,98**	0,98**	-0,98**	-0,98**	ns
ara/xil	Ns	ns	ns	ns	0,97*

Correlaciones de Pearson. (\*) indica una correlación con un  $p < 0,05$  y (\*\*) con un  $p < 0,01$ . (ns) indica que no se halló correlación entre los parámetros analizados.

En cuanto a la estructura o composición de los arabinoxilanos, sólo se encontró correlación positiva entre la relación ara/xil del extracto, y la cantidad de ácido propiónico en el contenido cecal del ratón que había consumido el mismo, lo cual indicaría que, a mayor cantidad de arabinosa unida a la cadena de xilosa, es decir, mayor grado de sustitución, menor es la capacidad que tienen las bacterias de fermentar los AXs.

#### 4.4. Correlaciones entre el efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo*

Después de haber analizado con los mismos extractos tanto el efecto prebiótico *in vitro* como *in vivo*, se realizó un análisis de correlación para ver si mostraban concordancia entre ellos (Tabla 22).

Se halló una correlación positiva entre el crecimiento relativo y la actividad prebiótica de *Lactobacillus* en relación a la cantidad final hallada de esta cepa en el microbioma de los ratones al final del tratamiento. Esto refleja una alta capacidad predictiva del potencial efecto prebiótico del ensayo *in vitro* realizado frente a la que se observa después en un estudio *in vivo*. Es importante resaltar con ambos estudios fueron realizados con las mismas muestras (AX d y AX b).

A su vez, se observaron correlaciones negativas entre CR y AP de *Lactobacillus*, y la cantidad al final del tratamiento en el perfil del microbioma de los ratones de *Bacteroides*

y *Enterococcus*, mostrando que a mayor desarrollo o metabolismo de la cepa de *Lactobacillus* es menor el desarrollo de cepas que se esperan no aumenten su metabolismo frente a un compuesto prebiótico como los AXs.

Tabla 22. Correlaciones entre los resultados hallados de efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo*.

	CR Lb	AP Lb	CR Bif
CR Lb	1,00		
AP Lb	ns	1,00	
CR Bif	Ns	ns	1,00
Bif	0,99**	0,98**	ns
Lb	0,99**	0,98**	ns
Clo	ns	ns	ns
Bac	-0,99**	-0,98**	ns
Enco	-0,99**	-0,98*	ns

(\*\*) indican una correlación de Pearson con un  $p < 0,01$ . ns indica que no se halló correlación entre los parámetros analizados.

No se han reportado estudios donde se realice con las mismas muestras de compuestos con potencial efecto prebiótico el estudio de su capacidad prebiótica tanto *in vitro* como *in vivo*. El hecho de que en este trabajo se haya realizado ambas pruebas sin ningún tipo de modificación en las muestras, y se haya encontrado resultados concordantes entre ellos, permite confirmar la eficiencia del análisis *in vitro* realizado, y la correlación que tiene con los resultados hallados al alimentar a los ratones con los mismos extractos. Esto es muy importante por que permite hacer un análisis rápido y fácil de los posibles compuestos con potencial efecto prebiótico confiando en que el resultado obtenido será representativo de lo que sucedería en el caso de que se realizaran con las mismas muestras el ensayo *in vivo*.

En función de los resultados obtenidos y las cantidades de AXs consumidas por los ratones durante el tratamiento, una persona debería consumir 320 mg de AXs por kg de peso corporal, que corresponde a 24 g para un adulto de 75 kg de peso. Esto hace factible pensar en el desarrollo de alimentos enriquecidos con estos extractos. Los arabinoxilanos solubles en agua, además de los efectos beneficiosos que muestran en la salud, tiene amplias cualidades de gelificación, viscosidad, entre otras, que no son

discutidas en este trabajo, que podrían facilitar la formulación de alimentos que contengan esta cantidad en su porción diaria. La formulación de un producto enriquecido con AXs se pensaría a partir de trigos duros, los cuales han mostrados tener un mejor efecto modulador sobre el microbioma intestinal.

## *CAPÍTULO 6*

### *ANÁLISIS DEL PERFIL DEL MICROBIOMA INTESTINAL UN MODELO ANIMAL DE SÍNDROME DE RETT*



Como se ha detallado en la introducción, y como se ha ido comprobando mediante los ensayos realizados en este trabajo, la modulación del microbioma intestinal mediante compuestos prebióticos es una herramienta importante y eficaz para modular la salud de las personas, tanto ejerciendo efectos beneficiosos en el intestino, como mediante las distintas interacciones que éste muestra con el sistema inmunológico y SNC. Los efectos de estas intervenciones no son solamente locales, sino que, se ha demostrado que las bacterias probióticas que aumentan su desarrollo y metabolismo frente a estos compuestos, actúan sobre el sistema nervioso central del individuo (Wallace *et al.* 2003; Simren *et al.* 2013). Existe un eje de fuerte modulación entre microbioma intestinal-sistema inmune-sistema nervioso (Borre *et al.* 2014; Wang y Kasper; 2014; Douglas-Escobar *et al.* 2013; Cryan y Dinan; 2012; Heijtz *et al.* 2011). Es por esto que la modulación del microbioma pretende intervenir en la sintomatología o las causas de las enfermedades neurológicas e inmunológicas a fin de lograr una mejora en el estado de salud (Vandenplas *et al.* 2015; Grootaert *et al.* 2009).

En numerosos estudios se ha demostrado que los pacientes con trastornos de espectro autista (TEA), muestran un perfil de microbioma intestinal diferente a los pacientes que no sufren dicha condición (Tomova *et al.* 2015; Buie *et al.* 2010; McElhanon *et al.* 2014). El Síndrome de Rett es uno de los pocos TEA del cual se conoce la causa genética, y se han generado varios modelos animales que reproducen muchos de los signos presentes en pacientes. Estos modelos animales han sido de gran utilidad para el estudio de la patogénesis de estos trastornos y para la generación de estrategias terapéuticas. Por ello, se procedió a explorar si existía también una variación en el perfil del microbioma intestinal de ratones que sufrían este síndrome (RTT), para pensar en una posible modulación del mismo utilizando extractos de arabinoxilanos solubles de harinas integrales de trigo. Esto permitiría mejorar la calidad de vida de pacientes con este síndrome, mediante la suplementación de alimentos enriquecidos con AX, que sean capaces de revertir la posible disbiosis hallada en la enfermedad a través de la modulación bacteriana del compuesto prebiótico.

Se trabajó con un modelo animal de ratones del modelo MeCP2-308, los cuales portan una proteína MeCP2 trunca (SHazbazian). Estos ratones comienzan a desarrollar signos neurológicos (temblores, alteraciones respiratorias) a partir de las 6 semanas de vida. Las muestras de materia fecal y contenido cecal fueron tomadas en estadios sintomáticos (semana 8) como se detalló en el inciso 7.5.

Para realizar el análisis de las diferencias entre la composición del microbioma intestinal de los ratones mutantes para MeCP2 y los *wild type*, se analizó el contenido cecal o materia fecal de 4 familias de ratones. La familia HET eran hembras heterocigotas y wt de 15 meses de edad sintomáticas y las otras 3 familias eran machitos wt y mut de 8 semanas recién empezando a ser sintomáticos. En la tabla 23 se enumeran las familias y se especifica a partir de qué matriz se realizó la extracción del ADN para su posterior análisis.

Tabla 23. Muestras de ratones para análisis de composición del perfil de microbioma intestinal.

Familia	N° de ratones	Matriz
MT 4	16	Materia fecal
MT 85	10	Materia fecal
MT 94	16	Materia fecal
HET	18	Contenido cecal

MT 4, 85 y 94 y HET fueron los nombres con los cuales se identificaron cada una de las familias de los ratones que se obtuvieron a partir de la misma madre.

En la figura 24 se muestra el perfil de composición del microbioma encontrado en los ratones con RTT (mut) y de aquellos que no tienen la mutación (wt), para cada una de las familias a partir de las cuales se obtuvieron las muestras. MT 4, 85 y 94 son ratones machos wt o mut de 8 semanas de edad. HET corresponde a un grupo de hembras heterocigotas sintomáticas y sus controles wt, de alrededor de 12 meses de edad.

La variabilidad biológica interindividual que se encontró entre los ratones que pertenecían al mismo grupo (mut o wt) y familia fue muy elevada; por lo cual no se pudieron encontrar diferencias significativas entre los grupos para ninguna cepa bacteriana evaluada. Sin embargo, puede observarse una tendencia del perfil del microbioma diferente en los grupos wt y mut de las distintas familias (figura 24).

El porcentaje de *Lactobacillus* fue mayor en el caso de los ratones con Síndrome de Rett en todas las familias analizadas, tanto en heces como contenido cecal. Se observó lo mismo en el caso de *Bifidobacterium*, siendo sólo mayor el porcentaje en los ratones wt en el caso de MT 85. Estudios previos han demostrado que el contenido de *Bifidobacterium spp.* en heces es menor en niños con trastornos generalizados del desarrollo, como el autismo (De Angelis *et al.* 2013; Adams *et al.* 2011), mientras que

*Lactobacillus*, el otro probiótico analizado, se informó que estaba presente en concentraciones más altas en niños con TEA (Tomova *et al.* 2015; Adams *et al.* 2011). Sin embargo, en otros estudios no se encontraron diferencias en los perfiles de microbioma intestinal informados entre niños con trastornos del espectro autista y sus hermanos neurotípicos (Gondalia *et al.* 2012).

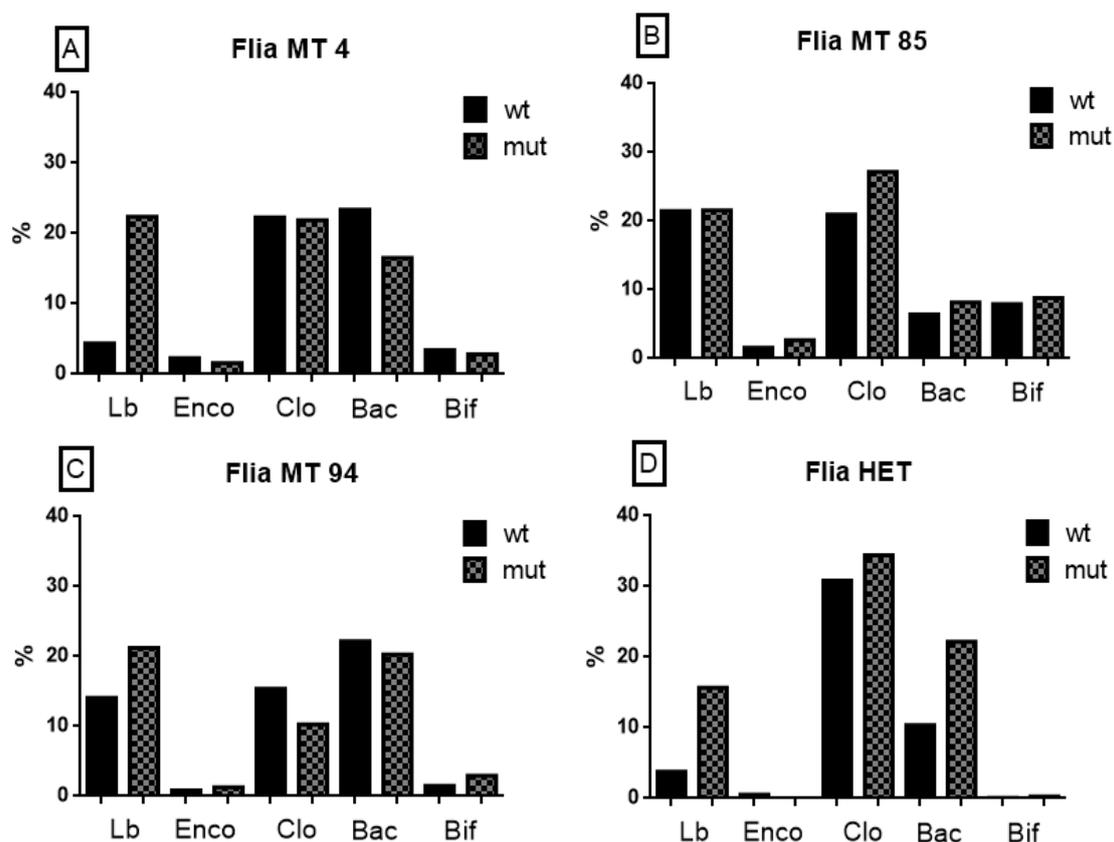


Figura 24. Porcentajes de las distintas cepas en relación con el gen 16 S universal. Promedios de mutantes (ratones con Síndrome de Rett) y Wilde type (wt) de cada una de cepas bacterianas analizadas, separadas por las distintas familias. Familia (Flia) MT 4 (A), Flia MT 85 (B), Flia MT 94 (C) y Flia HET (D). Distintas letras indican diferencias significativas con un  $p < 0.05$  entre cada una de las cepas.

En relación a *Clostridium*, con excepción de MT 94, los ratones con Síndrome de Rett tuvieron mayor porcentaje de esta cepa que los wt. El microbioma de los sujetos con TEA mostró, también, el aumento de la incidencia de *Clostridium* (Song *et al.* 2004; Parracho *et al.* 2005), una de las bacterias más abundantes en el intestino humano. Borghi *et al.* (2017) informaron que en RTT se observaba una menor diversidad del microbioma, y un enriquecimiento del mismo en *Clostridium* y *Bacteroides*. Puede

observarse que en todas las familias se encontraron altos porcentajes (mayores al 10%) de estos dos grupos bacterianos tanto en mutantes como en wt.

El promedio de la concentración de cada una de las cepas en cada caso, sin tener en cuenta a que familia pertenecen los ratones evaluados se muestran en la tabla 24. En esta misma tabla se pudo observar que, a pesar de la variabilidad entre las muestras, cuando se realizó un análisis de la varianza multivariado se evidenció que existen diferencias significativas entre la composición del microbioma de los ratones mutantes en comparación con los controles (wt).

Tabla 24. Análisis Multivariado del perfil del microbioma de ratones mutantes y *wild type*.

tipo	%Lb	% Bif	% Enco	% Bac	% Clo	
mut	17,10	4,77	3,67	14,00	27,68	A
wt	11,17	2,95	1,25	16,47	18,28	B

Letras distintas indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

Los ratones con Síndrome de Rett mostraron mayor cantidad de *Lactobacillus* en la composición del microbioma intestinal, así como de *bifidobacterias*; es decir, se ve aumentada la cantidad de probióticos. Sin embargo, es importante destacar que los porcentajes hallados de *bifidobacteria*, a pesar de ser mayores en el caso del síndrome de Rett son de los más bajos de las cepas cuantificadas, y que la cantidad de *Clostridium* en los microbiomas analizados es la más alta de todos. En este trabajo, los ratones wt y los mut mediante los cuales se realizaron las comparaciones eran de las mismas familias y se sabe que hay una gran influencia materna en el perfil del microbioma intestinal que podría enmascarar algunas diferencias tal vez mas marcadas entre ratones de distintas familias.

Strati *et al.* (2016), quienes trabajaron con mujeres jóvenes diagnosticadas con Síndrome de Rett, demostraron que este síndrome está asociado a una disbiosis tanto bacteriana como del componente fúngico del microbioma intestinal, lo que sugiere que las alteraciones del funcionamiento de MeCP2 favorecen el establecimiento de una comunidad microbiana adaptada al nicho gastrointestinal de sujetos RTT. La mayor proporción de *Lactobacullis spp.* fue descrita en pacientes con RTT, siendo además la

única cepa que mostro diferencias significativas cuando realizaron un t test. En ese mismo estudio, Strati *et al.* (2016), también encontró una mayor proporción de *bifidobacteria* (RTT 36.7 %; wt 17.2 %), siendo las medias encontradas mucho más altas que las observadas en el presente trabajo (Tabla 24). La abundancia relativa de *Bifidobacterium spp* no se halló, en cambio, en el estudio realizado por Borghi *et al.* (2017) en donde los pacientes eran de mayor edad. La abundancia de *bifidobacterias* está correlacionada inversamente con la edad de la persona (Turroni *et al.* 2008).

*Clostridium* también se encuentran en mayor proporción en el microbioma intestinal de los ratones con RTT (Tabla 24). Song *et al.* (2004) y Parracho *et al.* (2005) también informaron un aumento de *Clostridium* en el microbioma intestinal en modelos animales de TEA y en pacientes al igual que Strati *et al.* (2016).

No se observaron diferencias significativas de la abundancia relativa de *bacteroidetes* debido a la gran variabilidad, pero si se informó un menor valor de media del porcentaje de esta cepa en los ratones RTT (Tabla 24), en concordancia con lo hallado por Strati *et al.* (2016), que observaron una disminución significativa en sujetos RTT. En estudios sobre niños afectados por autismo también se observó esta disminución de *Bacteroides* (Tomova *et al.* 2015).

El microbioma intestinal bacteriano de los sujetos RTT es significativamente menos diverso que en el caso de individuos que no padecen el Síndrome. Strati *et al.* (2016) plantea la hipótesis de que las deficiencias de MeCP2 promueve el establecimiento de una comunidad microbiana intestinal disbiótica que, a su vez, podría afectar la fisiopatología gastrointestinal RTT a través de alteración de la producción de AGCC, reforzando el estreñimiento y favoreciendo la inflamación y desregulación de las citoquinas. La disbiosis intestinal de los ratones con Síndrome de Rett podría estar asociada con cambios en los perfiles del metabolismo intestinal, afectando la fisiología gastrointestinal (Fond *et al.* 2015).

El microbioma influye sobre la función del sistema nervioso central, y el SNC influye en la composición del microbioma a través de sus efectos sobre el tracto gastrointestinal (Rhee *et al.* 2009). El acetato, butirato y propionato, son claves, ya que su producción se basa en diversos factores como las especies microbianas que habitan el intestino, la fuente de sustrato, la disponibilidad y el tiempo de tránsito del intestino (Wong *et al.* 2006). La dieta puede tener un marcado impacto en todos los factores mencionados anteriormente (David *et al.* 2014; O'Keefe *et al.* 2015), modulando el microbioma intestinal, proporcionando una variedad de sustratos de fermentación, y aumentando o reduciendo el volumen fecal y su tránsito.

Hasta la fecha no se han realizado estudios sobre la intervención dietética y/o suplementación prebiótica o probiótica para mejorar los síntomas gastrointestinales y neurofisiológicos en pacientes con Síndrome de Rett; sin embargo, recientemente, se encontró que la suplementación en la dieta de pacientes RTT con diferentes compuestos mejora ciertos aspectos de la enfermedad en los pacientes (Signorini *et al.* 2014; Tabbaa *et al.* 2013). Por lo tanto, la dieta, el microbioma, el intestino y el cerebro parecen representar importantes puntos de intervención con el fin de mitigar o mejorar la progresión de la enfermedad. A pesar de las dificultades de alimentación, los pacientes con RTT no tienen restricciones dietéticas (Symons *et al.* 2013). Se necesitan estudios adicionales para evaluar los requerimientos nutricionales con el fin de establecer una dieta enfocada para estos pacientes.

Si bien los resultados presentados son preliminares, y se necesita del análisis de un mayor número de familias, las diferencias encontradas a nivel de los grupos bacterianos presentes en heces y contenido cecal entre ratones mutantes y wild type abre la posibilidad de estudiar una posible modulación del microbioma, incluyendo compuestos prebióticos como los AX en la dieta de los ratones con Síndrome de Rett. Los arabinosidos solubles a lo largo de este trabajo han demostrado modular el microbioma intestinal, y aumentar los metabolitos beneficiosos liberados por algunas cepas, como los AGCC (acético y bórico, principalmente). Esto podría mejorar o equilibrar el microbioma intestinal de pacientes con Síndrome de Rett, disminuir su sintomatología o mejorar su calidad de vida. La interacción entre las bacterias del intestino y el SNC está siendo estudiada enfáticamente, y un gran número de publicaciones apoyan esta hipótesis.

## *CAPÍTULO 7*

### *EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE ARABINOXILANOS SOLUBLES EN LA VIABILIDAD CELULAR EN LINEAS DE CANCER DE COLON*



Recomendaciones extraídas de un gran número de datos epidemiológicos junto con resultados experimentales, indican que se debe aumentar la ingesta de fibra para reducir el riesgo de cáncer colorrectal (Bingham *et al.* 2003). Los polisacáridos son una clase importante de fitoquímicos funcionales, y varios estudios han demostrado que tienen efectos farmacológicos beneficiosos, incluso contra el cáncer colorrectal y la colitis (Ji *et al.* 2018). Los experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de los extractos ricos en polisacáridos para proporcionar efectos protectores en el colon induciendo las vías de señalización PI3K/AKT, NF-B y MAPK, la apoptosis de las células tumorales, así como la regulación del microbioma intestinal (Ji *et al.* 2018). Los efectos sobre cáncer de colon de los polisacáridos están fuertemente relacionados a sus composiciones y configuraciones químicas (Ji *et al.* 2017; Jin *et al.* 2012; Wasser, 2002).

Los estudios *in vivo* han situado a los AX y los AXOS como posibles agentes anticancerígenos. Entre ellos se encuentran los datos obtenidos por Cao *et al.* (2011), quienes observaron efectos beneficiosos al realizar administración oral de AX a ratones inducidos con tumores. Por su parte, Femia *et al.* (2010) elaboraron un ensayo en el cual alimentaron ratas con una dieta rica en AXOS y las trataron con un agente carcinogénico. El consumo de este oligosacárido, corroboró que la ingesta de AXOS puede tener un efecto benéfico en la disminución de riesgo de cáncer.

Basados en estos datos bibliográficos, se realizó un ensayo en el cual se expusieron células HCT 116 (Línea celular de carcinoma colorrectal humano, que son tumorigénicas en nódulos de ratón y forman colonias en agarosa), a los extractos de arabinosilanos (AX b y AX d) para evaluar el efecto sobre su viabilidad. Los resultados que se obtuvieron se muestran en las figuras 25 y 26.

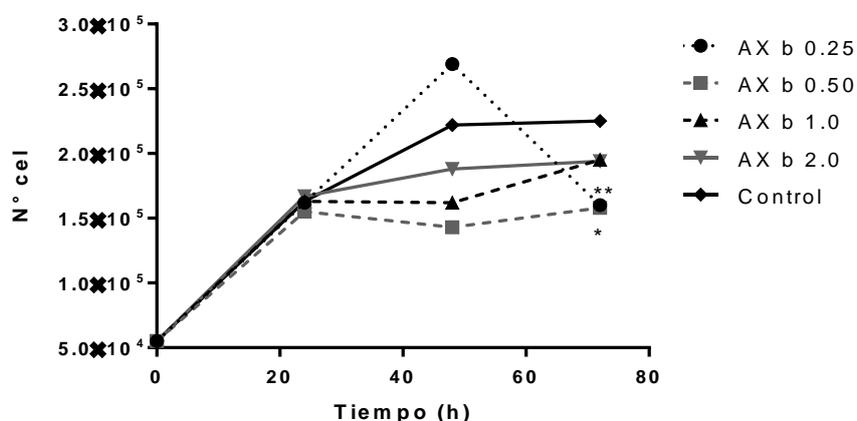


Figura 25. Curva de viabilidad celular de las células HCT 116 expuestas a las distintas concentraciones de AXs de trigo blando. El símbolo (\*) indica diferencia significativa de la muestra en relación al control con un  $p < 0,05$  y (\*\*) con un  $p < 0,01$ .

El extracto de arabinosilanos de trigos blandos mostró, en todos los casos, una disminución en la cantidad de células viables a las 72 h del ensayo en comparación con el control. Sin embargo, sólo las concentraciones menores, tanto de 0,25 y 0,50 mg/mL fueron significativamente diferentes (figura 25). El porcentaje de células viables al finalizar el ensayo fue de aproximadamente el 71 - 73 % para las células expuestas a esas dos concentraciones, y del 86 - 87 % para AX b 1,0 y 2,0 mg/mL. Cabe destacar que en el caso de AX b 0,25 mg/mL a las 48 h del ensayo se encontró un número de células viables mayor al control y al de todas las concentraciones evaluadas del extracto, que ya mostraban a ese tiempo una disminución de la viabilidad con respecto al inicio del tratamiento (figura 25).

Cuando las mismas células se expusieron al extracto de arabinosilanos de trigo duro, se observó que todas las concentraciones con las que se trabajó, a excepción de 0,50 mg/mL (100 % de viabilidad celular) tuvieron una viabilidad celular final significativamente menor al control. AX d 0,50 mg/mL mostró un importante incremento del número de células viables a las 24 h del ensayo y no mostró diferencias con el control al final del mismo (figura 26). Las otras tres concentraciones analizadas presentaron a las 72 h un 70 - 71 % de células viables, como en el caso de las concentraciones bajas del AX b, pero el AX d 1,0 mg/mL llegó a disminuir hasta un 55 - 56 % el porcentaje de viabilidad.

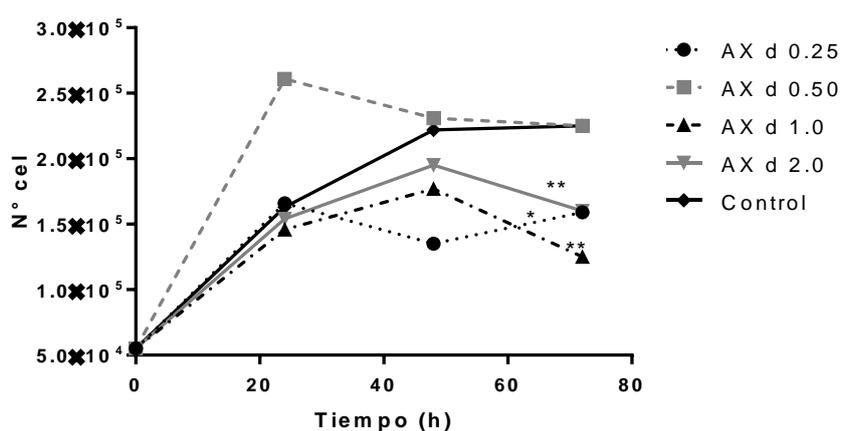


Figura 26. Curva de viabilidad celular de las células HCT 116 expuestas a las distintas concentraciones de AXs de trigo duro. El símbolo (\*) indica diferencia significativa de la muestra en relación al control con un  $p < 0,05$  y (\*\*) con un  $p < 0,01$ .

Como puede observarse en la figura 27, todos los tratamientos mostraron diferencias significativas con el control negativo, arrojando valores de viabilidad celular menores. Sin embargo, no se encontraron diferencias importantes entre ellos.

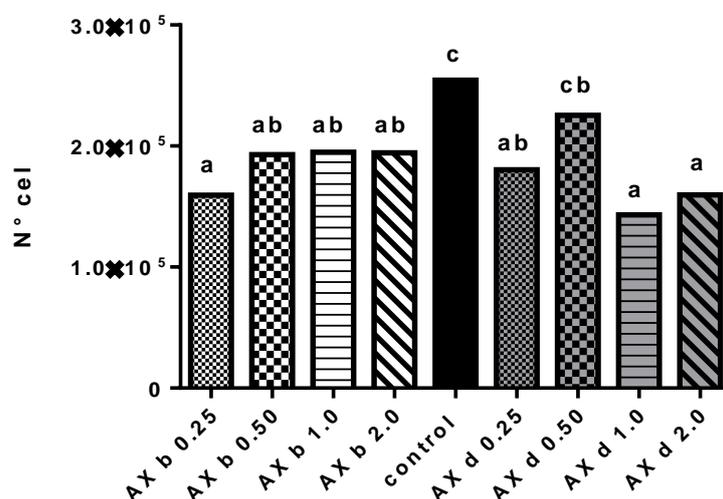


Figura 27. Número de células a las 72 h del ensayo para todas las concentraciones de los extractos de trigo duro y blando, y control negativo. Distintas letras en las columnas indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

Cheng *et al.* (2016) obtuvo un polisacárido soluble en agua a partir de cebada de peso molecular promedio de 67 KDa, compuesto de glucosa, xilosa, arabinosa y ramnosa que inhibía la proliferación de células de cáncer de colon humano (HT 29) similares a las HCT 116 de manera dependiente del tiempo y de la dosis. Este compuesto modelaba la fosforilación de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK), procesos asociados con las especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibición de la translocación del factor nuclear B (NF-B) del citoplasma al núcleo y apoptosis celular. Mostró hasta un 71.5 % de inhibición a las 48 h de exposición. Este polisacárido era de características químicas muy similares a los extractos de los arabinosilanos con lo que se trabajó en este experimento, por lo que podrían ser algunas de las vías a través de las cuales los AXs están ejerciendo su efecto (Cheng *et al.* 2016).

Hay varios tipos de mecanismo de acción que podrían estar ejerciendo los AX sobre las células de cáncer de colon. Los polisacáridos interfieren con la familia de factores de transcripción NF-κB, que es un regulador clave de la inflamación y el cáncer (Schottelius y Dinter, 2006). Este factor induce la expresión de citoquinas inflamatorias, moléculas

de adhesión y factores angiogénicos que pueden prevenir la inflamación y el cáncer asociado (Pan *et al.* 2011 y Tak y Firestein, 2001), y la presencia de polisacáridos aumentaría su expresión.

Otros datos han sugerido varios posibles mecanismos de acción de los polisacáridos. La vía de señalización PI3K/AKT desempeña un papel importante en la proliferación y procesos apoptóticos de las células, y se activa en la mayoría de las células tumorales (Sun *et al.* 2017). PI3K conduce a la fosforilación de AKT, y si la ruta de señalización PI3K/AKT está activada, la proporción de la forma fosforilada de AKT (p-AKT) es elevada. Otros autores han demostrado que varios polisacáridos ejercen su acción contra el cáncer mediante el bloqueo de esta vía (Kong *et al.* 2015 y Yu *et al.* 2015). TP53 es un potente supresor de tumores que puede prevenir la propagación de células que portan lesiones oncogénicas a través de una multitud de vías (Vousden y Prives, 2009). Varios estudios han demostrado que los polisacáridos también tienen la capacidad de inhibir el ciclo celular, obstruyendo la progresión de las células de cáncer de colon, incluso aquellos de 570 KDa de peso molecular (Shao *et al.* 2015), aún mayores a los AXs con lo que se trabajó en este estudio. Asimismo, se ha demostrado que el hecho de que las bacterias del colon produzcan ácidos grasos de cadena corta y mantengan el pH intestinal, promoviendo la maduración de las células inmunes y la apoptosis de las células del cáncer de colon (Huang *et al.* 2017).

### *1.1. Hidrólisis de los extractos de AX con xilanasa*

Está bien establecido que los tamaños moleculares de los polisacáridos están estrechamente asociados con sus actividades biológicas. Los efectos anti-cáncer colorrectal de los polisacáridos son más efectivos en compuestos con bajo peso molecular, cuya conformación espacial puede ser fácilmente unida por las células tumorales (Ji *et al.* 2018). Investigaciones anteriores han indicado que las características estructurales de los polisacáridos, como los enlaces  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6) en la cadena, son importantes por sus características contra el cáncer de colon porque pueden aumentar las actividades de las células inmunocompetentes o inducir la apoptosis de las células tumorales (Wasser, 2002 y Ermakova *et al.* 2013).

Los extractos de AXs provenientes de trigos duros y blandos tienen un rango de tamaño molecular comprendido entre 120 y 15 KDa (capítulo 2, figura 9) por lo tanto se hidrolizaron estos extractos con el objeto de obtener un rango de tamaño molecular

menor (AXOS). Los AXOS se obtuvieron a partir del tratamiento con endo-1,4- $\beta$ -xilanas a 40 °C por 30 min y se realizó nuevamente el ensayo de viabilidad celular bajo las mismas condiciones, con los compuestos de menor TM obtenidos. Las diferencias del tamaño molecular de los extractos antes y después de ser hidrolizados se muestran en las figuras 28 y 29.

Para el caso de AX b, puede observarse como el pico de mayor tamaño correspondiente a las moléculas que salen entre los 32 y 46 min de tiempo de retención disminuye de manera importante, y para el extracto hidrolizado no se observan moléculas eluidas antes de los 38.8 min (>210 kDa). La muestra hidrolizada, además, mostró contener moléculas de aproximadamente 1,28 KDa y un importante pico de 8 Da, notoriamente menor, que no se observa en la hidrólisis de AX d (figura 29).

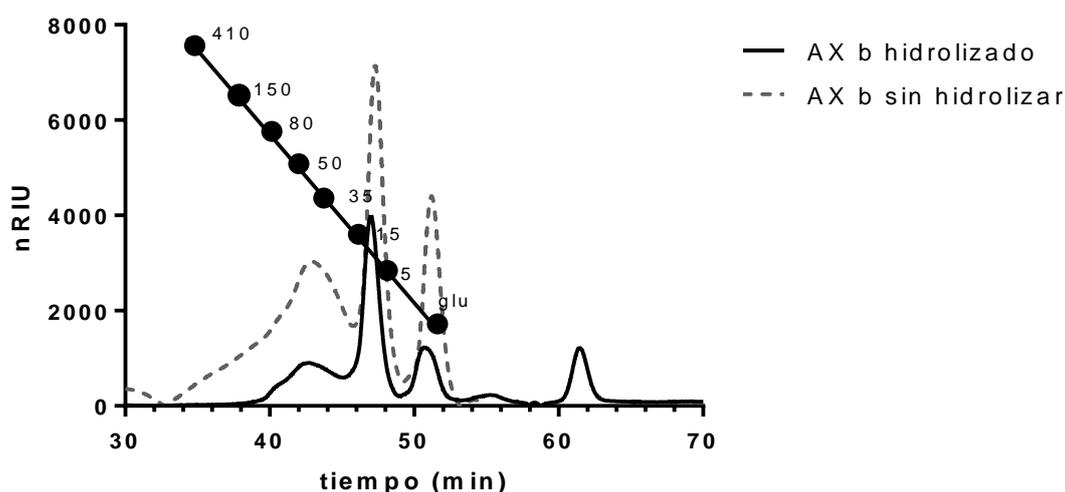


Figura 28. Distribución del tamaño de molecular del extracto de trigo blando antes y después de ser hidrolizado.

En el caso del trigo duro, los extractos mostraron modificaciones más marcadas. El pico que aparecía entre los 31 y 42 min, de gran tamaño molecular desapareció por completo al ser hidrolizado con xilanas, y aparecieron dos picos de 160 y 29 Da (55 y 58,5 min), que no se observaban en el extracto sin hidrolizar.

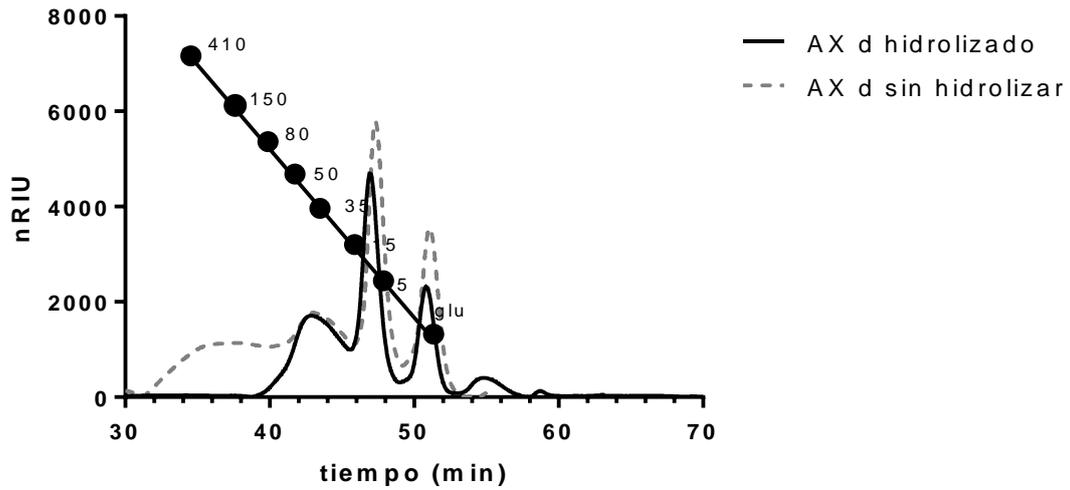


Figura 29. Distribución del tamaño de molecular del extracto de trigo duro antes y después de ser hidrolizado.

Al comparar los productos finales de los dos extractos después del tratamiento con la xilanasa se observó que los perfiles obtenidos son bastante similares, encontrándose los mismos picos a los 42, 47, 51 y 55 min (30, 5, 1 y 0,2 KDa respectivamente) en ambas muestras, pero las moléculas más pequeñas que se liberan son notoriamente diferentes. El extracto de AX d muestra dos picos correspondientes a 1,60 y 0,29 KDa, como se resaltó anteriormente, y el blando un importante pico de tamaño aún menor (0,08 KDa).

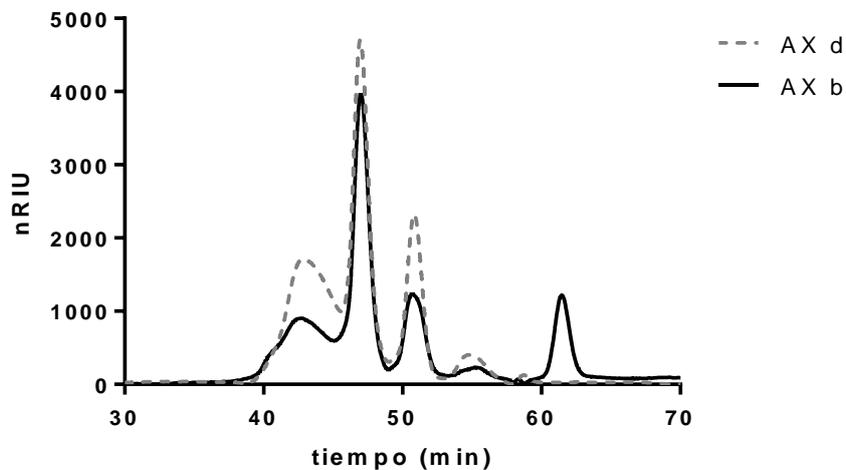
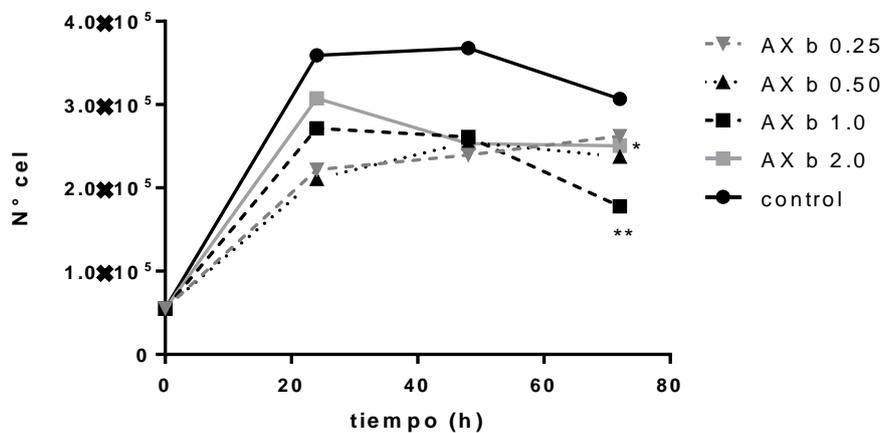


Figura 30. Extractos de AX de trigo duro y blando después del tratamiento con xilosa.

## 1.2. Análisis de la viabilidad celular frente a los extractos hidrolizados

Al realizar el ensayo de MTT con los extractos de arabinoxilanos hidrolizados se observó, en ambos casos, una disminución aún mayor de la viabilidad de las células frente a todas las concentraciones a las cuales fueron expuestas. Los extractos de arabinoxilanos blandos arrojaron resultados de viabilidad celular significativamente menores que el control en todos los casos, siendo entre un 77 - 85% la viabilidad celular para el tratamiento con las concentraciones AX b 0.25, 0.50 y 2.0 mg/mL. Se observó una disminución todavía más marcada de la viabilidad celular de las células HCT 116 para el AX b 1.0 mg/mL, llegando a ser tan sólo de un 57 % (figura 31).



31. Curva de viabilidad celular de las células HCT 116 respuestas a las distintas concentraciones de AXs de trigo blando luego de la hidrólisis con Xilanas. (\*) indica diferencia significativa de la muestra en relación al control con un  $p < 0,05$  y (\*\*) con un  $p < 0,01$ .

El descenso de la viabilidad celular de la línea HCT 116 fue notablemente más eficaz con el AX hidrolizado correspondiente a la muestra de trigo duro. El comportamiento de las células mostró una reducción de la viabilidad celular a valores de 62 - 63 % para el caso de las concentraciones menores (0.25 y 0.50 mg/mL), y de hasta sólo el 23 - 26 % para AX d 1.0 y 2.0. En todos los casos significativamente menor al control (figura 32). Esto significa que el tratamiento con las dosis mayores disminuyó la viabilidad celular en más de un 70%.

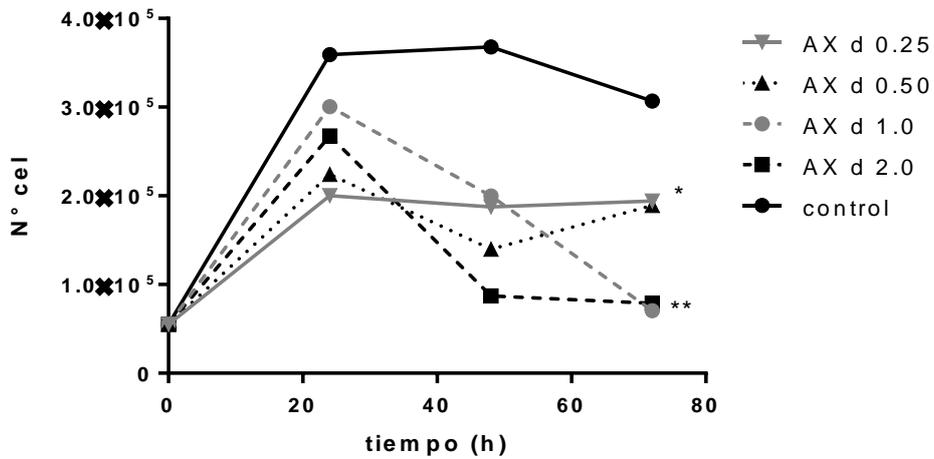


Figura 32. Curva de viabilidad celular de las células HCT 116 respuestas a las distintas concentraciones de AXs de trigo duro luego de la hidrólisis con Xilanasas. (\*) indica diferencia significativa de la muestra en relación al control con un  $p < 0.05$  y (\*\*) con un  $p < 0.01$ .

Estos resultados podrían deberse a que el AX duro una vez realizado el tratamiento con xilanasas dio como resultado una mayor cantidad de moléculas de menor tamaño para ejercer efecto sobre la línea celular evaluada, debido a que contenía una cantidad más alta de moléculas de mayor tamaño que el AX blando que fueron completamente hidrolizadas con la enzima.

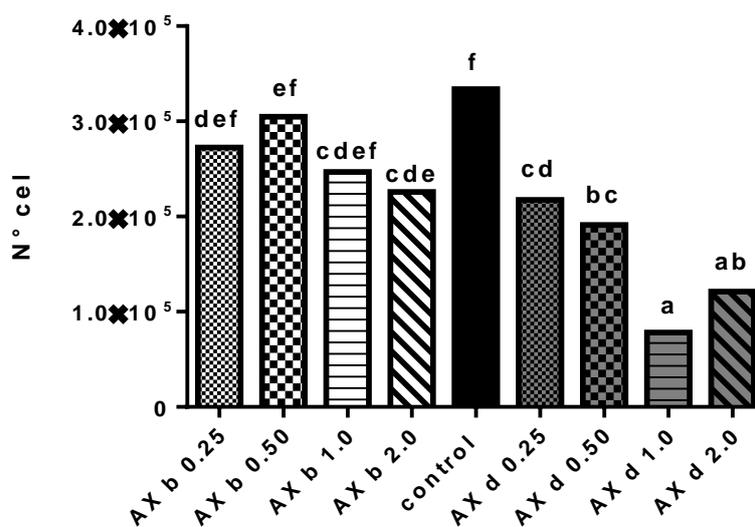


Figura 33. Número de células a las 72 h del ensayo para todas las concentraciones de los extractos luego de ser hidrolizados de trigo duro y blando, y control negativo. Distintas letras en las columnas indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

La disminución del número de células HCT 116 en presencia del extracto de trigo duro en las concentraciones 1.0 y 2.0 mg/mL fueron significativamente menores no sólo al control negativo, sino a todos los otros tratamientos, mostrando una disminución importante en la viabilidad del linaje de células cancerosas (figura 33). Todas las concentraciones de la muestra AX d indujeron importantes disminuciones en la viabilidad celular. Se pudo observar, también, que ambas muestras tienen efectos concentración dependiente, aun para el caso de AX b, a pesar de mostrar efectos menos marcados que con el extracto de trigo duro, tanto antes como después de la hidrólisis.

La pectina de papaya soluble en agua extraída de diferentes etapas de maduración y, por lo tanto, con diferente nivel de hidrólisis y TM de sus polisacáridos, causó disminuciones muy importantes en la viabilidad celular, diferentes en función de su nivel de maduración (Bernardino *et al.* 2017). Algunas de las muestras arrojaron resultados similares a los de este trabajo. El extracto de pectina que se caracterizó por ser el de menor tamaño molecular y contener mayor cantidad de ramificaciones, fue el que dio mejores resultados (Bernardino *et al.* 2017). El AX d, el cual fue el que mayor efecto mostró en este trabajo, fue a su vez el que contenía una concentración más alta de moléculas de menor TM.

El hecho de que las bacterias colónicas tengan la capacidad de liberar enzimas capaces de hidrolizar los AX en el intestino disminuyendo el TM, como se demostró en el capítulo de fermentación *in vitro* (capítulo 4), podría ocasionar un efecto similar al de la hidrólisis que se realizó con xilanasas en los extractos evaluados, obteniendo de esta manera los productos del tamaño molecular con el cual se encontró la mayor disminución de la viabilidad celular de la línea HCT 116 frente a los extractos, al ingerir el AX y ser hidrolizado por el microbioma intestinal.

Se ha demostrado que la esterasa microbiana del ácido ferúlico y la xilanasas están presentes en el tracto gastrointestinal humano durante la fermentación del salvado de trigo (Vardakou *et al.* 2007), y que esta primera, puede ser liberada por *Lactobacillus acidófilo*. También fue previamente demostrado que la xilanasas estaba presente durante la fermentación de salvado de trigo en el colon de un modelo humano (Kroon *et al.* 1997), y que la presencia de la enzima se observó en la fermentación de arabinoxilanos por el microbioma intestinal de niños (Hopkins *et al.* 2003). Vardakou *et al.* (2007) también encontró que las fracciones de arabinoxilanos indujeron la producción de xilanasas en fermentaciones realizadas en un simulador del colon humano. Esto nos

permitiría confirmar que, al ingerir los AX, los mismos podrían ser hidrolizados en el intestino por xilanasas liberadas por las bacterias allí presentes de manera similar a como se realizó *in vitro* en este trabajo, disminuyendo su tamaño molecular y logrando así, que ejerzan el efecto evidenciado sobre las células tumorales en el colon. Por lo tanto, este efecto, sumado a la producción de AGCC en el intestino, principalmente de ácido butírico que se ha demostrado es un potente efecto en tumores colorrectales, podrían generar un ambiente desfavorable para las células tumorales de cáncer de colon.

## CONCLUSIONES



En esta tesis se propuso estudiar el contenido y composición de la fibra dietética de las harinas integrales obtenidas a partir de cultivares de trigo pan y líneas experimentales de trigo blando cultivadas en la Argentina, siendo en el caso de los trigos duros los cultivares de mayor consumo en la zona. Se puso especial énfasis en el análisis de los arabinoxilanos solubles y su efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo*, así como su posible acción sobre células de cáncer de colon cultivadas *in vitro*.

Se evaluó un importante número de cultivares tanto de trigos duros como blandos y se encontró que las harinas de grano entero de los dos tipos de trigo mostraron diferencias entre ellas. La fracción correspondiente al endosperma de los trigos blandos presentó un tamaño de partícula menor, mientras que la media del tamaño de partícula de la harina integral resultó mayor que la de trigos duros, debido al mayor tamaño del salvado. Los trigos blandos presentaron concentraciones significativamente mayores de fibra dietaria, y menores cantidades de arabinoxilanos, lo cual luego se vio reflejado en la pureza y rendimiento de los extractos de AXs obtenidos a partir de ellos.

En cuanto a su estructura, los extractos de AXs de trigos duros presentaron una fracción de moléculas de gran tamaño molecular (entre 400 y 50 KDa), que no se observó en los de trigo blando. Sin embargo, la media del TM de la mayoría de las moléculas de AX d fue menor, aunque no significativamente distinta a la de AX b. El índice de ara/xil no mostró valores significativamente distintos entre los extractos de los dos tipos de trigo. Las diferencias encontradas en la distribución de tamaño de partícula en las harinas integrales de ambos tipos de trigo podrían influir no sólo en la cantidad de AXs extraídos sino también en el diferente rango de tamaño molecular observado entre los extractos obtenidos a partir de cada tipo de trigo.

Funcionalmente, los extractos de arabinoxilanos solubles evaluados con inóculos de cepas bacterianas puras, mostraron tener actividad prebiótica al hacer un análisis *in vitro* según los índices de crecimiento relativo (CR), actividad prebiótica (AP) e índice prebiótico (IP) calculados. El extracto de AX de trigo duro fue el que presentó el mayor índice prebiótico, siendo la muestra AX 3, obtenida a partir de harinas de este tipo de trigo, la que arrojó el valor más alto de todas las muestras analizadas. El crecimiento y metabolismo de *Lactobacillus reuteri* presentó una correlación negativa con el índice ara/xil de los extractos, haciendo referencia a una mayor capacidad de fermentación del AX cuando es menor sustitución de la cadena de xilosa. Los AX solubles también mostraron capacidad para aumentar el desarrollo de *Bifidobacterium breve*, el cual que mostró, a su vez, una correlación negativa con el desarrollo de *Clostridium*, indicando una modulación entre las cepas del microbioma favorable para el huésped.

Si bien se encuentra en la bibliografía información sobre la fermentación AX solubles extraídos de distintas capas del grano de trigo y de AXOS, no se han encontrado estudios sobre AXs extraídos a partir de harinas de grano entero de trigos duros y blandos, cuya composición y acción prebiótica fueron estudiadas en este trabajo.

Tanto en la fermentación *in vitro* como en el tratamiento *in vivo* en modelo murino, los arabinoxilanos solubles tuvieron la capacidad de aumentar la cantidad de bacterias probióticas (*Lactobacilos* y *bifidobacterias*) y de disminuir la de *Clostridium* en el perfil de microbioma intestinal analizado. A su vez, aumentaron la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en cada ensayo, confirmando que son capaces de ejercer un efecto prebiótico y de realizar una modulación favorable sobre el microbioma intestinal, tanto en muestras de materia fecal humana como en un modelo murino *in vivo*. Se observaron correlaciones positivas entre los aumentos de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, con el incremento de la concentración de AGCC, al igual que se confirmaron correlaciones entre los índices calculados *in vitro* y los resultados obtenidos después de alimentar a los ratones con las mismas muestras de AXs. No se conocen otros estudios donde se hayan evaluado el efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo* utilizando los mismos extractos de AXs. Las correlaciones encontradas sugieren que los índices *in vitro* permiten estimar el efecto prebiótico *in vivo*.

El extracto de AXs obtenido a partir de trigos blandos mostró un patrón de fermentación más rápido que el de trigo duro, produciendo un aumento de los AGCC en un período de tiempo menor. Aun así, AX d mostró un aumento significativamente mayor en la concentración de ácido butírico e isobutírico, y la metabolización total de las moléculas de mayor tamaño que este presentaba. A su vez, el perfil de distribución de tamaño molecular de ambos extractos fue diferente a las 12 y 24 h de fermentación, confirmando que existen diferencias en la manera en que las bacterias fermentan los AXs de los distintos tipos de trigo. Ambos extractos aumentaron la cantidad de bacterias probióticas y las concentraciones finales de AGCC, demostrando una vez más su efecto prebiótico.

Las diferencias encontradas entre la velocidad y la capacidad de fermentación de los AXs, así como en los efectos que estos ejercen en el intestino, se deberían al distinto rango de tamaño las moléculas extraídas a partir de cada tipo de trigo, así como a diferencias en el grado de sustitución, aunque estas últimas no fueron muy marcadas. Otros aspectos que podrían influir en la funcionalidad de los AXs son el grado de polimerización y diferencias en los tipos de enlaces que presentan en su cadena, aunque no fueron corroborados en este trabajo.

El extracto de arabinosilanos de los trigos duros (AX d) fue el que produjo mayores concentraciones de AGCC, así como un aumento más marcado en el crecimiento del contenido de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* tanto *in vitro* como *in vivo*. Este efecto diferencial respecto a los extractos de trigo blando podría deberse a que las moléculas de mayor TM que este extracto contenía fueron completamente metabolizadas. No es de menor importancia destacar que AX d se obtuvo a partir de cultivares de trigos argentinos que son utilizados para la elaboración de panificados y otros alimentos derivados de los cereales y que son de alto consumo en nuestro país.

El extracto de AX d mostró, también, una disminución de la viabilidad celular en el linaje de células de cáncer de colon significativamente mayor al producido por el extracto de trigo blando. La hidrólisis enzimática de los extractos y la disminución del tamaño molecular incrementó el porcentaje de disminución de la viabilidad celular en el modelo HCT 116. Este es un novedoso e importante hallazgo que abre camino a posibles tratamientos de cáncer de colon con estos compuestos.

A su vez, se confirmaron diferencias entre la composición del microbioma intestinal de ratones con Síndrome de Rett y wt, observándose mayores proporciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el caso de RTT, así como una menor cantidad de *Bacteroides*. La concentración de *Clostridium* fue la más alta de las cepas analizadas, y aun significativamente mayor para los ratones con RTT. Habiéndose comprobado la capacidad de los AX solubles de trigo para modular de manera favorable el perfil del microbioma intestinal, así como el aumento de metabolitos secundarios como AGCC, que también ejercen efectos beneficiosos sobre el intestino, se plantea la utilización de estos extractos para suplementos dietarios o formulaciones de alimentos funcionales, que podrían ser de suma importancia para el tratamiento de diferentes trastornos de comportamiento, como el Síndrome de Rett.

Los arabinosilanos solubles de las harinas de trigo, entonces, han demostrado tener la capacidad de modular el microbioma intestinal de manera favorable y de producir la liberación de metabolitos beneficiosos para la salud (AGCC), así como de disminuir la viabilidad de células cancerígenas en colon. El consumo de AXs contenidos en alimentos (ya sea suplementados o enriquecidos con estas moléculas) ejercería efectos beneficiosos en la salud del organismo, incluso en algunos trastornos o enfermedades que han demostrado caracterizarse por disbiosis de la flora intestinal, además de la sintomatología que éstas presentan. El consumo de los AXs para mantener el equilibrio o modular perfiles más favorables del microbioma intestinal, puede ser un importante

aporte a la calidad de vida tanto de personas saludables, como aquellas que sufren ciertas patologías.

### *Proyecciones futuras...*

En función de los resultados obtenidos en esta tesis sería importante:

- Estudiar con mayor detalle y precisión los tipos de enlaces y nivel de sustitución de los AXs con los cuales se trabajó, para evaluar el grado de atribución que tienen en las diferencias en el perfil de fermentación del microbioma intestinal que se encontraron entre los extractos de los trigos duros y blandos;
- Evaluar la capacidad de los AXs para modular el perfil del microbioma intestinal en modelos murinos de TEA, como el estudiado en este trabajo (RTT);
- Investigar el mecanismo de acción mediante el cual los AXs disminuyen la viabilidad celular en células de carcinoma de colon (HCT 116);
- Desarrollar formulaciones de alimentos enriquecidos con niveles de AXs de trigos duros argentinos con un comprobado efecto prebiótico y con aceptable calidad tecnológica y sensorial como para ser introducidos al mercado.



*Producción científica lograda a partir de la tesis:*

- Paesani C, Salvucci E, Moiraghi M, Fernandez Canigia L y Pérez GT. 2018. Arabinoxylan from Argentinian whole wheat flour promote the growth of *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium breve*. (Orcid ID : 0000-0002-6565-9266);
- Paesani, Candela; Salvucci, Emiliano, Guy Jean; Pérez, Gabriela T. "Evaluation of prebiotic effect in vitro of extracts of soluble arabinoxylans obtained from whole wheat flour" en 12th International Symposium on Lactic Acid Bacteria. Agosto 2017, Holanda;
- Paesani Candela; Salvuccio Emiliano; Moiraghi Malena; Fernandez Canigia Liliana; Perez Gabriela T. Prebiotic effect of digested whole grain flour and arabinoxylans extract. LACC4 – 4th Conferencia Latinoamericana de Cereales (4th ICC Latin American Cereals Conference) organizada junto con la ICC- International Association for Cereal Science and Technology. Marzo 2018, Mexico;
- Paesani Candela; Salvucci Emiliano; Pérez Gabriela T. Evaluación del crecimiento de bacterias probióticas in vitro en presencia de extractos de arabinoxilanos de dos tipos de trigo. XIII Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE. Agosto del 2018;
- Paesani Candela; Sciarini Lorena S; Pérez Gabriela T. Distribución de tamaño de partícula de harinas de grano entero de trigos duros y blandos. Relación con su composición. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Octubre 2018.



## REFERENCIAS



- AACC, American Association of Cereal Chemists, 2000. Approved Methods of the AACC, Ninth Edition. The Association, USA.
- Aachary, A. A., y Prapulla, S. G. (2008). Corn-cob-induced endo-1,4-beta-d-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: Production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(11), 3981–3988. <https://doi.org/10.1021/jf073430i>.
- Abdolmaleky HM, Zhou JR y Thiagalingam S. An update on the epigenetics of psychotic diseases and autism. *Epigenomics*. 2015;7(3):427-49. doi: 10.2217/epi.14.85
- Adams E. L., Kroon P. A., Williamson G, Gilbert H.J. y Morris V.J. Inactivated enzymes as probes of the structure of arabinoxylans as observed by atomic force microscopy. *Carbohydrate Research* 339 (2004) 579–590
- Adams J.B., Johansen L.J., Powell L.D., Quig D. y Rubin R.A., Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism-comparisons to typical children and correlation with autism severity, *BMC Gastroenterol.* 11 (2011) 22.
- Alam R, Abdolmaleky HM y Zhou J-R. Microbiome, inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2017;1–10.
- Al-Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M., y Hassan, F.A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *J. Funct. Foods* 5, 1542–1553.
- Amir R. E, Van den Veyver I. B, Wan M, Tran CQ, Francke U y Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 1999;23(2):185–8.
- Amrein, T. M., Gränicher, P., Arrigoni, E. y Amadò, R. (2003). In vitro digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *LWT - Food Science and Technology.* 36: 451-460.
- Andrewartha, K.A., Phillips, D.R. y Stone, B.A. (1979). *Carbohydr. Res.*, 77, 191-204.
- Antoine, C., Peyron, S., Mabilhe, F., Lapiere, C., Bouchet, B. y Abecassis, J. (2003). Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2026–2033.
- Backhed F y Crawford PA. Coordinated regulation of the metabolome and lipidome at the host-microbial interface. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 240 -- 245.
- Baevre A.B. 1999. Skadd stivelse i hvetemel-malemetoder og betydning for ferdig produkt. MATFORSK, Norwegian food research institute. *InforMAT* 2: 25-27.
- Bakhtiar, S.M., LeBlanc, J.G., Salvucci, E., Ali, A., Martin, R., Langella, P., Chatel, J.M., Miyoshi, A., Bermudez-Humaran, L.G. y Azevedo, V. (2013). Implications of the human microbiome in inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Lett* 342, 10–7.
- Barlow K K., Butrose M.S., Simmonds D.H. y Vesik M. The nature of the starch±protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry* 50 (1973) 443±454.
- Barrera G N, Pérez G T, Ribotta P D y León A E, 2007. Influence of damaged starch on cookie and bread-making quality. *European Food Research and Technology*, 225: 1–7.

- Barron, C., Surget A. y Rouau X. (2006). Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science* 45 (2007) 88–96.
- Bechtel D. B., Wilson J. D. y Martin C. R. Determining Endosperm Texture of Developing Hard and Soft Red Winter Wheats Dried by Different Methods Using the Single-Kernel Wheat Characterization System, 1996. *Cereal Chem.* 73(5):567-570.
- Bercik P, Collins SM y Verdu EF. 2012. Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 24: 405–13.
- Bercik P, Denou E, Collins J, y Jackson W. 2011a. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141: 599–609, 609.e1–3.
- Bercik P, Park AJ, Sinclair D y Khoshdel A. 2011b. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 23: 1132–9.
- Bernalier A., Dore J., y Durand M. Biochemistry of fermentation. Gibson G., Roberfroid M. (eds) *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Dordrecht:Kluwer Academic Publishers; 1999. p 37-53.
- Bernardino Ramos do Prado S., Fernandez Ferreira G., Harazono Y., Misuzu Shiga T., Raz A., Carpita N. C. y Fabi J. P. Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. *Nat. Scientist reports* 7: 16564 | DOI:10.1038/s41598-017-16709-3.
- Bingham SA, Day NE., Luben R., Ferrari P., Slimani N., Norat T., Clavel-Chapelon F., Kesse E., Nieters A., Boeing H., Tjnneland A., Overvad K., Martinez C., Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A., Vineis P., Tumino R., Krogh, V. , Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PHM., Berglund G., Hallmans G., Lund E., Skeie G., Kaaks R. y Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *THE LANCET* • Vol 361 • May 3, 2003.
- Blackwood A, Salter J, Dettmar P y Chaplin M, 2000. Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. *J. R. Soc. Promot. Health* 120, 242e247.
- Bonnet U, Bingmann D y Wiemann M. Intracellular pH modulates spontaneous and epileptiform bioelectric activity of hippocampal CA3-neurones. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000, 10:97.
- Borghi E, Borgo F., Severgnini M., Savini MN., Casiraghi MC. y Vignoli A. Rett Syndrome: A Focus on Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 344; doi:10.3390/ijms18020344.
- Borre YE, O’Keeffe GW, Clarke G y Stanton C. 2014. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol. Med.* 20: 509–18.
- Bressiani J, Oro T, Santetti GS, Almeida JL, Bertolin TE, Gomez M y Gutkoski LC, 2017. Properties of whole grain wheat flour and performance in bakery products as a function of particle size. *Journal of Cereal Science* 75 269-277.

- Broekaert, W. F. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 178–194 (2011).
- Budny J.A., Fornal J. y Obuchowski W. Analysis of correlations between contents of protein fractions in wheat endosperm models and their mechanical resistance. *Journal of Cereal Science* 71 (2016) 10e18.
- Buie T., Campbell D.B. I, Fuchs G.J., Furuta G.T., Levy J y Van de Water., J. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in Individuals with ASDs: a consensus report, *Pediatrics* 125 (2010) S1eS18.
- Buksa, K., Nowotna A., Praznik, W., Gambús H., Ziobro R. y Krawontka J. (2010). The role of pentosans and starch in baking of wholemeal rye bread. *Food Research International* 43 (2010) 2045–2051.
- Buksa, K., Praznik, W., Loeppert, R. y Nowotna, A. (2016). Characterization of water and alkali extractable arabinoxylan from wheat and rye under standardized conditions. *J. Food Sci. Technol.* 53, 1389–1398. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2135->
- CAA, Código Alimentario Argentino, Ley 18.284 18/07/69, Decreto 2126/71-Reglamentario de la Ley 18.284. 2009/10a. Alimentos Farináceos - Cereales, Harinas y Derivados. Capítulo IX.
- Cadieux, P., Wind, A., Sommer, P., Schaefer, L., Crowley, K., Britton, R.A. y Reid, G. (2008). Evaluation of Reuterin Production in Urogenital Probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4645–4649.
- Caers M, Coutteau P y Sorgeloos p, 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, Volume 186, Issues 1–2, 1 June 2000, Pages 157-171.
- Caesar R, Fak F y Backhed F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *J Intern Med* 2010; 268: 320 -- 328.
- Calfa G, Percy AK y Pozzo-Miller L. Experimental models of Rett syndrome based on Mecp2 dysfunction. *Exp Biol Med* (Maywood). 2011;236(1):3–19.
- Campbell G.M., Bunn P.J., Webb C. y Hook, S.C.W., 2001. On predicting roller milling performance. Part II. The breakage functions. *Powder Technology* 115, 243–255.
- Campbell K.G., Bergman C. J., Gualberto D. G., Anderson J. A., Giroux M. JJ. , Hareland G., Fulcher, Mark R. G., Sorrells E., y Finney P. L. Quantitative Trait Loci Associated with Kernel Traits in a Soft x Hard Wheat Cross. *Crop Sci.* 39:1184-1195 (1999).
- Campos-Castello J, Fernandez-Mayoralas DM, Muñoz-Jareño N y Antonio- Arce V. Síndrome de Rett: 50 años de historia de un trastorno aun no bien conocido. (2007). *Med* ISSN 0025-7680. 2007;67:531–42.
- Cannizzaro C, Monastero R, Vacca M y Martire M: [3H]-DA release evoked by low pH medium and internal H<sup>+</sup> accumulation in rat hypothalamic synaptosomes: involvement of calcium ions. *Neurochem Int* 2003, 43:9.

- Cao L., Liu, X., Qian, T., Sun, G., Guo, Y., Chang, F., Zhou, S., y Sun, X. (2011). Antitumor and immuno-modulatory activity of arabinoxylans: a major constituent of wheat bran. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48(1): 160-164.
- Castillo M, Martín-Oru SM, Manzanilla EG., Badiola I, Martín M. y Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 114 (2006) 165–170.
- Chaplin M, F, 2003. Fibre and water binding, *Proceedings of the Nutrition Society* 62 (1): 223-227.
- Chen CH y Bushuk W, 1970. Nature of proteins in Triticale and its parental species I, Solubility characteristics and amino-acid composition of endosperm proteins, *Canadian Journal of Plant Science*, 50: 9-14.
- Cheng D, Zhang X, Meng M, Han L, Li C, Hou L, Qi W y Wang C. Inhibitory effect on HT-29 colon cancer cells of a water-soluble polysaccharide obtained from highland barley, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 88–95.
- Cheng H. y Lai M. Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing Serum and Hepatic Cholesterol in Rats. *The Journal of Nutrition*, Volume 130, Issue 8, 1. 2000, Pages 1991–1995, <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.1991>.
- Chung OK., Ohm JB, Caley MS y Seabourn B. 2001. Prediction of baking characteristic of hard winter wheat flours using computer-analyzed mixograph parameters. *Cereal Chem.* 78:493-497.
- Collins SM, Surette M y Bercik P. 2012. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 735–42.
- Cook S. y Sellin J. Short Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1998; 12(6) 499-507.
- Costabile A., Klinder, A., Fava, F., Napolitano, A., Fogliano, V., Leonard, C. y Tuohy, K. M. (2008). Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: A double-blind, placebo-controlled, crossover study. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 110–120.
- Costello EK, Lauber CL y Hamady M. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009; 326:1694--7.
- Cremonini F y Gasbarrini A. Atopy, *Helicobacter pylori* and the hygiene hypothesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Jun;15(6):635–6.
- Crittenden R., Karppinen, S., y Ojanen, S. (2002). In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 781-789.
- Cryan JF y Dinan TG. 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 701–12. .
- Cummings J. Short Chain Fatty Acids in the Human Colon. *GUT* 1981; 22(9) 763-779
- Cummings J. y Macfarlane G. The Control and Consequences of Bacterial Fermentation in the Human Colon. *Journal of Applied Bacteriology* 1991; 70(6) 443-459.

- Cummings J., Roberfroid M., Andersson H., Barth C., Ferro-Luzzi A., Ghos Y., Gibney M., Hermonsen K., James W., Korver O. A New Look at Dietary Carbohydrate: chemistry, physiology and health. *European Journal of Clinical Nutrition* (1997) 51, 417±423.
- Cuniberti M, Mir I, Chialvo E, Berra O, Macagno, S. y Pronotti M. 2016. Rendimiento y calidad del trigo en la región central del país. *Information para Extension*. [www.inta.gob.ar/mjuarez](http://www.inta.gob.ar/mjuarez).
- Dammann K W, Hauge D, Rosen RA, Schroeder N y Marquart L, 2013. Consumption and consumer challenges of wholegrain foods. En J. A. Delcour, & K. Poutanen (Eds.), *Fibre- rich and wholegrain foods* (1st ed.) pp. 130-131.
- David L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A.V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014, 505, 559–563.
- De Angelis M, Piccolo M., Vannini L., Siragusa S., De Giacomo A. y Serrazanetti ,D.I. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified, *PLoS One* 8 (2013) 18.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotic M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G y Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS* (2010) vol. 107, no. 33. 14691–14696.
- de La Serre CB, Ellis CL, y L. J. 2010. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299:G440-448.
- De Theije CGM, Wopereis H, Ramadan M y van Eijndthoven T. 2014. Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun*. 37: 197–206.
- Delwiche SR, 2000. Wheat endosperm compressive strength properties as affected by moisture. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 43, 365–373.
- Delzenne NM y Cani PD (2011) Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annu Rev Nutr* 31: 15-31.
- Delzenne NM, Neyrinck AM y Cani PD. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Fact* 2011b; 10: S10.
- Dervilly G., Saulnier L., Roger P. y Thibault J.-F. Isolation of Homogeneous Fractions from Wheat Water-Soluble Arabinoxylans. Influence of the Structure on Their Macromolecular Characteristics. *J. Agric. Food Chem*. 2000, 48, 270-278.
- Dervilly, G., Leclercq, C., Zimmermann, D., Roue, C., Thibault, J.-F. y Saulnier, L. (2002). Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. *Carbohydrate Polymers*, 47(2),143–149.
- Diamant M, Blaak EE y de Vos WM. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obes Rev* 2010; 12: 272 -- 281.

- Doblado-Maldonado A F, Pike O A, Sweley J C y Rose D J. Key issues and challenges in whole wheat flour milling and storage, *Journal of Cereal Science* 56 (2012) 119e126.
- Dornez E, Gebruers K, Joye I J, De Ketelaere B, Lenartz Massaux C, Bodson B, Delcour JA y Courtin C M, 2008. Effects of genotype, harvest year and genotype-by-harvest year interactions on arabinoxylan, endoxylanase activity and endoxylanase inhibitor levels in wheat kernels. *Journal of Cereal Science*, 47: 180189.
- Douglas-Escobar M, Elliott E y Neu J. 2013. Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain. *JAMA Pediatr.* 167: 374–9.
- Duncan S. H., Lobley G. E., Holtrop G., Ince J., Johnstone A. M., Louis P. y Flint H. J. 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity* 32:1720-1724.
- Edwards CA. The physiological effects of dietary fiber, in *Dietary Fiber in Health and Disease*, Ed by Kritchevsky D and Bonald C, Eagan Press, St Paul, MN, pp 58±71 (1995).
- Ehrhart F, Coort SLM, Cirillo E, Smeets E, Evelo CT y Curfs LM. Rett syndrome - biological pathways leading from MECP2 to disorder phenotypes. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):158–71.
- El-Ansary A.K.; Ben Bacha, A. y Kotb, M. Etiology of autistic features: The persisting neurotoxic effects of propionic acid. *J. Neuroinflamm.* 2012, 9, 74.
- Eliasson A y Larsson K, 1993. Bread, En: *Cereals in Breadmaking*, Eliasson A., Larsson K, (eds,) Marcel Dekker, USA. pp, 325-363.
- Ermakova S, Menshova R, Vishchuk O, Kim SM, Um BH, Isakov V y Zvyagintseva. Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis* structural characteristics and antitumor activity, *Algal Res.* 2 (2013) 51–58.
- Esposito F, Arlotti G, Bonifati A M, Napolitano A, Vitale D y Fogliano V, 2005. Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International* 38(10): 1167-1173.
- Evans JM, Morris LS, y Marchesi J. 2013. The gut microbiome: The role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J. Endocrinol.*
- Evers A. D. and Lindley J. 1977. The particle-size distribution in wheat endosperm starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28:98-101.
- Every D, Morrison SC, Simmons L.D y Ross M.P., 2006b. Distribution of glutathione in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour. *Cereal Chemistry* 83, 57e61.
- Every D, Simmons L.D y Ross, M.P., 2006a. Distribution of redox enzymes in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour. *Cereal Chemistry* 83, 62e68.
- FAO. 2015. *The State of Food Insecurity in the World*, pp. 1-56. [www.fao.org](http://www.fao.org).
- FAOSTAT. 2015. División estadística de la Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Informe producción mundial de granos. Publicado en internet, disponible en: <http://faostat3.fao.org>.

- FDA. FDA provides guidance on “Whole Grain” for manufacturers [cited 2010 Jun 1]. Disponible en: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108598.htm>. University Press, Oxford, UK, p. 156.
- Femia A. P., Salvadori, M., Broekaert, W. F., Francois, I. E., Delcour, J. A., Courtin, C. M. y Caderni, G. (2010). Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) reduce preneoplastic lesions in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). *European Journal of Nutrition*. 49(2): 127-132.
- Finnie SM, Bettge AD y Morris CF, 2006. Influence of cultivar and environment on water-soluble and water-insoluble arabinoxylans in soft wheat. *Cereal Chemistry*, 83: 617-623.
- Fiorini D, Boarelli MC, Gabbianelli R, Ballini R y Pacetti D. A quantitative headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detector method to analyze short chain free fatty acids in rat feces. *Analytical Biochemistry* 508 (2016) 12e14.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. In: R. C. Bast, Jr., D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, J. F. Holland, and E. Frei, III (eds.), *Cancer Medicine*, Ed. 5, pp. 132–152. Hamilton, Ontario, Canada: B. C. Decker, 2000.
- Fond G., Boukouaci W., Chevalier G., Regnault A., Eberl G., Hamdani N., Dickerson K., Macgregor A., Boyer L., Dargel A., Oliveira J., Tamouza R. y Leboyer M. The “psychomicrobiotic”: Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review *Le microbiote intestinal: un rôle potentiel dans les troubles psychiatriques majeurs*. *Pathologie Biologie* 63 (2015) 35–42.
- Forest V., Clement M., Pierre F., Meflah K., y Menanteau J.. 2003. Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells. *Nutr. Cancer* 45:84–92.
- Foster JA, McVey y Neufeld K-A. 2013. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci*. 36: 305–12.
- Fukuda S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., Taylor, T.D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M. y Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543–547.
- Fulcher RG y Duke TK, 2002. Whole-grain structure and organization: Implications for nutritionists and processors. En L, Marquart, L, Slavin, & R, G, Fulcher (Eds.), *Whole-grain foods in health and disease* St, Paul, Minnesota: AACCC International, pp, 9-45.
- Galliard T. 1986. Hydrolytic and oxidative-degradation of lipids during storage of wholemeal flour - effects of bran and germ components. *Journal of Cereal Science*, 4: 179-192.
- Garodia P, Ichikawa H, Malani N, Sethi G y Aggarwal BB. From ancient medicine to modern medicine: ayurvedic concepts of health and their role in inflammation and cancer. *J Soc Integr Oncol* 2007; 5:25– 37. [PubMed: 17309811].

- Geurts L. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol* 2011; 2: 1 -- 17.
- Gibson G. Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin. *The Journal of Nutrition* 1999; 129(7) 1438S-1441.
- Gibson G.R. y Fuller R. Aspects of In Vitro and In Vivo Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human Use. 0022-3166/00; 2000. American Society for Nutritional Sciences. .
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401–1412.
- Giroux M J y Morris CF, 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 6262-6266.
- Glei M., Hofmann, T., Küster, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G. y Pool-Zobel, B.L. (2006). Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxicactivities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *Journal of Agriculturaland Food Chemistry*, 54(6), 2088–2095.
- Glenn GM y Saunders RM, 1990. Physical and structural properties of wheat endosperm associated with grain texture. *Cereal Chemistry*, 67: 176-182.
- Glitso LV y Bach Knudsen KE, 1999. Milling of whole grain rye to obtain fractions with different dietary fibre characteristics. *Journal of Cereal Science*, 29, 89–97.
- Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke WS, Courtin CM, Gebruers K, y Delcour JA, 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 12-30.
- Gómez Pallarés M, León AE y Rosell CM, 2007. Trigo; en León A.E., Rosell C.M., editores, *De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. 1ra Edición. Hugo Baéz editor. Córdoba, Argentina. Pág. 19-33.
- Gondalia S.V, Palombo E.A., Knowles S.R., Cox S.B, Meyer D. y Austin D.W.. Molecular characterisation of gastrointestinal microbiota of children with autism (with and without gastrointestinal dysfunction) and their neurotypical siblings, *Autism Res.* 5 (2012) 419e427.
- Gong L., Cao, W., Chi, H., Wang, J., Zhang, H., Liu, J., y Sun, B. (2018). Whole cereal grains and potential health effects: Involvement of the gut microbiota. *Food Research International*, 103, 84.
- Gonzales ML y LaSalle JM. The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 2010;12(2):127–34.
- Graf D., Cagno, R. D., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., y Watzl, B. (2015). Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 26(1), 477–480.

- Graveland A, 1980. Extraction of wheat proteins with sodium dodecyl sulphate. *Annales de Technologie Agricole*, 29: 113-123.
- Greenblatt GA, Bettge AD, y Morris C F, 1995. Relationship between endosperm texture and the occurrence of friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem.* 72:172-176.
- Greenwell P y Schofield JD, 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem* 63:379-380.
- Grootaert C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W. y Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 64e71.
- Grootaert, C., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Broekaert, W. F., Courtin, C. M. y Delcour, J. A. (2009). Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, 231e242.
- Grubben MJ, van den Braak CC y Essenberg M. Effect of resistant starch on potential biomarkers for colonic cancer risk in patients with colonic adenomas: a controlled trial. *Dig Dis Sci.* 2001;46:750–756.
- Hamer H. M., Jonkers, D. M. A. E., Venema, K., Vanhoutvin, S. A. L. W., Troost, F. J., y Brummer, R. J. (2008). Review article: The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 104–119.
- Hashimoto S, Shogren M y Pomeranz Y, 1987. Cereal pentosans: Estimation and significance Pentosans in wheat and milled wheat products. *Cereal Chemistry*, 64: 30-34.
- Heijtz RD, Wang S, Anuar F y Qian Y. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 3047–52.
- Heinio RL, Lehtinen P, Oksman-Caldentey KM y Poutanen K, 2002. Differences between sensory profiles and development of rancidity during long term storage of native and processed oat. *Cereal Chemistry* 79, 367e375.
- Hemdane S, Langenaeken NA, Jacobs PJ, Verspreet J, Delcour JA y Courtin CM, 2016. Study of the intrinsic properties of wheat bran and pearlins obtained by sequential debranning and their role in bran-enriched bread making. *Journal of Cereal Science* 71 78e85.
- Hemery Y, Rouau X, Dragan C, Bilici M, Beleca R y Dascalescu L, 2009. Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. *Journal of Food Engineering* 93 (2009) 114–124.
- Hong BH, Rubenthaler GL y Allan RE, 1989. Wheat pentosans I cultivar variation and relationship to kernel hardness. *Cereal Chemistry* 66 (1989) 369±373.
- Hopkins M. J., Englyst, H. N., Macfarlane, S., Furrie, E., Macfarlane, G. T., y McBain, A. J. (2003). Degradation of cross-linked and non-crosslinked arabi-noxylans by the

- intestinal microbiota in children. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(11): 6354-6360.
- Hosenev RC, 1994a. Structure of Cereal. En: *Principles of Cereal Science and Technology*. Second Edition, Editado por Hosenev RC, American Association of Cereal Chemists, USA, 1-27.
  - Hsiao C. K., Liao, J. W., Chung, Y. C., Hsieh, C. P., y Chan, Y. C. (2004). Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *The Journal of nutrition*. 134: 1523-1528. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115621109>.
  - Hsiao EY, McBride SW, Chow J y Mazmanian SK. 2012. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 109: 12776–81.
  - Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE y Petrosino JF. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013;155(7):1451–63
  - Huang X, Nie S, y Xie M. Interaction between gut immunity and polysaccharides, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 57 (2017) 2943–2955.
  - Huebner J., Wehling, R.L. y Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *Int. Dairy J*. 17, 770–775.
  - Hughes S. A., Shewry, P. R., Li, L., Gibson, G. R., Sanz, M. L., y Rastall, R. A. (2007). In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(11): 4589-4594.
  - Humphreys P y Barrowman N. The Incidence and Evolution of Parkinsonian Rigidity in Rett Syndrome : A Pilot Study. *Can J Neurol Sci*. 2016;43(4):567–73.
  - Hung PV, Maeda T y Morita N, 2007. Physicochemical Characteristics of Starches of Two Sets of Near-isogenic Wheat Lines with Different Amylose. *Content Starch-Stärke* 59: 125-131.
  - Igrejas G, Gaborit T, Oury FX, Chiron H, Marion D y Branlard G, 2001. Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationships to technological parameters in French bread wheats. *Journal of Cereal Science*, 34: 37–47.
  - Indrio F, Martini S, Francavilla R, Corvaglia L, Cristofori F y Mastrolia SA. Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. *Front Pediatr [Internet]*. 2017 [cited 2017 Aug 22];5. Available from: [http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2017.00178/full?utm\\_source=Email\\_t\\_o\\_rerev\\_&utm\\_medium=Email&utm\\_content=T1\\_11.5e4\\_reviewer&utm\\_campaign=Email\\_publication&journalName=Frontiers\\_in\\_Pediatrics&id=286554](http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2017.00178/full?utm_source=Email_t_o_rerev_&utm_medium=Email&utm_content=T1_11.5e4_reviewer&utm_campaign=Email_publication&journalName=Frontiers_in_Pediatrics&id=286554).
  - Izumi K, y Azumi, N. Japan Patent JP 2,001,226,409 (2001).
  - Izydorczyk M. S., y Dexter J.E.. Barley b-glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. *Food Research International* 41 (2008) 850–868.

- Jaskari J., Kontula P., Siitonen A., Jousimies-Somer H., Mattila-Sandholm T. y Poutanen K. Oat  $\beta$ -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 (1998) 175–181.
- Ji X, Peng Q, Yuan Y, Shen J, Xie W y Wang M. Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from jujube fruit (*Ziziphus jujuba* Mill.): a review, *Food Chem.* 227 (2017) 349–357.
- Jin M, Zhao K, Huang Q, Xu C y Shang J. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: a review, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 713–722.
- Johnson CL y Versalovic J. 2012. The Human Microbiome and Its Potential Importance to Pediatrics. *Pediatrics* 129: 950–60.
- Jonathan MC,. van den Borne J.G.C, van Wiechen P, Souza da Silva C, Schols HA y Gruppen H. In vitro fermentation of 12 dietary fibres by faecal inoculum from pigs and humans. *Food Chemistry* 133 (2012) 889–897.
- Karppinen S., Liukkonen K., Aura A., Forssell P. y Poutanen K. In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *J Sci Food Agric* 80:1469±1476 online: 2000.
- Kasarda DD, Bernardin J y Nimmo C, 1976. Wheat proteins. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol, 1. Pomeranz Y, (ed.). American Association of Cereal Chemistrysts, USA, pp, 158-236.
- Katz DM, Bird A, Coenraads M, Gray SJ, Menon DU y Philpot BD. Rett Syndrome : Crossing the Threshold to Clinical Translation. *Trends Neurosci.* 2016;39(2):100–13.
- Kaufmann WE, Stallworth JL, Everman DB y Skinner SA. Neurobiologically-based treatments in Rett syndrome : opportunities and challenges. *Expert Opin Orphan Drugs.* 2016;4(10):1043–55.
- Kerbel R. S. Tumor angiogenesis: past, present, and the near future. *Carcinogenesis (Lond.)*, 21: 505–515, 2000.
- Khan IA, Procnier JD, Humphreys DG, Tranquilli G, Schlatter AR, Marcucci-Poltri S, Froberg R y Dubcovsky J,2000. Development of PCR-based markers for a high grain protein content gene from *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* transferred to Microtests bread wheat. *Crop Sci.* 40:518–52.
- Khan K y Bushuk W, 1979. Studies of glutenin, XII. Comparison of SDS-PAGE of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chemistry*, 56:63-68.
- Khatkar BS, Fido RJ, Tatham AS y Schofield JD, 2002. Functional properties of wheat gliadins. II. Effects on dynamic rheological properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 35: 307- 313.
- Kihlberg I, Johansson L, Kohler A y Risvik E, 2004. Sensory qualities of whole wheat pan bread e influence of farming system, milling, and baking technique. *Journal of Cereal Science* 39: 67-84.

- Kim W, Choi SG, Kerr WL, Johnson JW y Gaines CS, 2004. Effect of heating temperature on particle size distribution in hard and soft wheat flour. *Journal of Cereal Science* 40 (2004) 9–16.
- Kolida S., Tuohy K. y Gibson G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* (2002), 87, Suppl. 2, S193–S197.
- Kong D, Chen F y Sima NI. Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in bladder cancer cells via Src and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, *Exp. Ther. Med.* 10 (2015) 1725–1731.
- Koropatkin N. M., Cameron, E. A., y Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 10(5),323–335.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S y Kelly B. Regulation of Colon Carcinoma Cell Invasion by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cancer Res* 2003;63:1138-1143.
- Kroon P.A., Faulds C.F., Ryden P., Robertson J.A. y Williamson G., *J. Agric.Food Chem.* 45 (1997) 661–667.
- Kumar H, Lund R, Laiho A, Lundelin K, Ley RE y Isolauri E. Gut Microbiota as an Epigenetic Regulator: Pilot Study Based on Whole-Genome Methylation Analysis. *mBio*. 2014 Dec 31;5(6):e02113-14.
- Lagaert S., Pollet A., Delcour J.A., Lavigne R., Courtin C.M. y Volckaert G. Substrate specificity of three recombinant  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their divergent action on arabinoxylan and arabinoxylan oligosaccharides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402 (2010) 644–650.
- Lagaert, S. Van Campenhout, A. Pollet, T.M. Bourgois, J.A. Delcour, C.M. Courtin, G. y Volckaert, Recombinant expression and characterization of a reducing-end xylose-releasing exo-oligoxyranase from *Bifidobacterium adolescentis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 5374–5377.
- Larroque O, Gianibelli M, Gómez Sánchez M y MacRitchie F, 2000. Procedure for obtaining stable extracts of cereal flour and whole meal for size-exclusion HPLC analysis. *Cereal Chemistry*, 77:448-450.
- Lee HJ, Lee EO, Rhee YH, Ahn KS, Li GX, Jiang C, Lu J y Kim SH. 2006. An oriental herbal cocktail, ka-mi-kae-kyuk-tang, exerts anti-cancer activities by targeting angiogenesis, apoptosis and metastasis. *Carcinogenesis* 27:2455–2463.
- Lempereur I., Rouau X. y Abecassis J. Genetic and Agronomic Variation in Arabinoxylan and Ferulic Acid Contents of Durum Wheat (*Triticum durum* L.) Grain and Its Milling Fractions. *Journal of Cereal Science* 25 (1997) 103–110.
- León AE y Rossel C. *De tales panes, tales panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica* (2006). Córdoba: Hugo Báez Editor. ISBN 9789871311071.
- Leonard H, Cobb S y Downs J. Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(1):37–51.

- Ley RE, Hamady M y Lozupone C, 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*; 320:1647---51.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, y Gi Ji. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022-1023.
- Li S, Morris CF y Bettge AD, 2009. Genotype and Environment Variation for Arabinoxylans in Hard Winter and Spring Wheats of the U.S. Pacific Northwest. *Cereal Chemistry*, 86:88–95.
- Li YZ y Posner ES, 1987. The Influence of Kernel Size on Wheat Millability. *Association of Operative Millers Technical Bulletin* Nov:5089.
- Liotta L. A. y Kohn, E. C. Invasion and metastasis. In: R. C. Bast, Jr., D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, J. F. Holland, and E., Frei, III (eds.), *Cancer Medicine*, Ed. 5, pp. 121–131. Hamilton, Ontario, Canada: B. C. Decker, 2000.
- Lopez H. W., Levrat, M. A., Guy, C., Messenger, A., Demigné, C. y Rémésy, C. (1999). Effects of soluble corn bran arabinoxylans on cecal digestion, lipid metabolism, and mineral balance (Ca, Mg) in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 10(9): 500-509.
- MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, Franklin AE, Hoffman JE, Boond F, Taylor AR, Kavaliers M y Ossenkopp KP: Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res* 2007, 176:149
- Macfarlane G. y Macfarlane S. Models for Intestinal Fermentation: Association between Food Components, Delivery Systems, Bioavailability and Functional Interactions in the Gut. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18(2) 156-162.
- Macpherson AJ, Hunziker L y McCoy K, 2001. Ig A responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.*;3:1021---35.
- Maes C. y Delcour J. A. Structural Characterisation of Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylans in Wheat Bran. *Journal of Cereal Science* 35 (2002) 315–326.
- Mai V. Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr Rev.*2004; 626Pt1:235---42.
- Malunga L.N. y Beta T. Antioxidant Capacity of Water-Extractable Arabinoxylan from Commercial Barley, Wheat, and Wheat Fractions. *Cereal Chemistry Journal* 92(1); 29-36.
- Manning TS y Gibson GR, 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology* 18: 287-298.
- Margolles A., C.G. y de los Reyes-Gavilán, Purification and functional characterization of a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 5096–5103.
- Marquart L, Jacobs D, McIntosh G, Reicks M y Poutanen K. (Eds.), 2007. *Whole grains and health*. Ames, IA, USA: Blackwell Publishers.
- Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK y Cryan JF 2014. Gut Microbes and the Brain: Paradigm Shift in Neuroscience. *J. Neurosci.* 34: 15490–6.

- McElhanon B.O., McCracken C., Karpen S. y Sharp W.G., Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis, *Pediatrics* 133 (2014) 872e883.
- McKenzie C, Tan J, Macia L y Mackay CR. The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunol Rev.* 2017 Jul;278(1):277–95.
- Mendis M., y Simsek, S. (2014). Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocoll., Special Issue: International Conference on Halal Gums 2012* 42, 239–243.
- Menezes EW, Dan MC, Cardenette GH, Goñi I, Bello-Pérez LA y Lajolo FM (2010) In vitro colonic fermentation and glycemic response of different kinds of unripe banana flour. *Plant Foods Hum Nutr* 65 (4):379-385.
- Menkovska M, Knezevic D, Ivanoski M. 2002. Protein allelic composition, dough rheology, and baking characteristics of flour mill streams from wheat cultivars with known and varied baking qualities. *Cereal Chemistry*, 79: 720-725.
- Mentschel J., y R. Claus. 2003. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism* 52:1400–1405.
- Meuser F. y Suckow, P. (1986). Nonstarch polysaccharides. In J. M. V. Blanshard, P. J. Frazier, & T. Galliard (Eds.), *Chemistry and physics of baking* (pp. 42e61). London, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Mikami K, Kimura M y Takahashi H. 2012. Influence of Maternal Bifidobacteria on the Development of Gut Bifidobacteria in Infants. *Pharmaceuticals* 5: 629–42.
- Moiraghi M, Vanzetti L, Bainotti C, Helguera M, León AE y Pérez GT, 2011. Relationship between soft wheat flour physicochemical composition and cookie-making performance. *Cereal Chemistry* 88: 130-136.
- Moretti P, Bouwknecht JA, Teague R, Paylor R, Zoghbi HY. Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14(2):205–220.
- Morgan DK y Whitelaw E. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome.* 2008;19(6):394–7.
- Morris CF y Massa AN, 2003. Puroindoline genotype of the U.S. National Institute of Standards and Technology Reference Material 8441 “Wheat Hardness”. *Cereal Chemistry*, 80: 674–678.
- Morris CF y Rose SP, 1996. Wheat. En: *Cereal Grain Quality*, Henry RJ, and Kettlewell, PS (eds.) Chapman and Hall, London, pp, 3-54.
- Morrison WR, Law RV y Snape CE, 1993. Evidence for inclusion complexes of lipids with V-amylose in maize, rice and oat starches. *Journal of Cereal Science*, 18: 107–109.
- Navarro J.B., Mashburn-Warren, L., Bakaletz, L.O., Bailey, M.T. y Goodman, S.D. (2017). Enhanced Probiotic Potential of *Lactobacillus reuteri* When Delivered as a Biofilm on Dextranomer Microspheres That Contain Beneficial Cargo. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00489>.

- Neul JL, Lane JB, Lee H, Geerts S, Barrish JO y Annese F. Developmental delay in Rett syndrome : data from the natural history study. *J Neurodev Disord.* 2014;6(1):1–9.
- Neyrinck A. M., Possemiers, S., Druart, C., Van de Wiele, T., De Backer, F. y Cani, P. D. (2011). Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia.
- Ng P y Bushuk W, 1987. Glutenin of marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 64:324-327.
- Noort MW, Daanvan Haaster J, Hemery Y, Henk A, Schols, Rob J y Hamer, 2010. The effect of particle size of wheat bran fractions on bread quality. Evidence for fibre e protein interactions. *Journal of Cereal Science* 52 59-64.
- Noratto GD, Garcia-Mazcorro JM., Markel M., Martino HS, Minamoto Y., Steiner JM., Byrne D., Suchodolski JS. Y Mertens-Talcott SU. (2014). Carbohydrate-Free Peach (*Prunus persica*) and Plum (*Prunus domestica*) Juice Affects Fecal Microbial Ecology in an Obese Animal. Peach and Plum Juices Alter Fecal Microbial Ecology Volume 9 | Issue 7 | e101723.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBOJ.* 2006; 7:688---93.
- O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F y Chen K. 2005. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*; 128:541---51.
- O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE y Dinan TG. 2015. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* 277: 32–48.
- of fecal microbiota in children with autism spectrum disorders and neurotypical siblings in the Simons simplex collection, *PLos One* 10 (2015) 19.
- Oikarinen S., Heinonen, S. y Karppinen, S. (2007). Plasma enterolactone or intestinal Bifidobacterium levels do not explain adenoma formation in multiple intestinal neoplasia (Min) mice fed with two different types of rye-bran fractions. *British Journal of Nutrition.*90: 119-125.
- O'Keefe S.J.; Li, J.V.; Lahti, L.; Ou, J.; Carbonero, F.; Mohammed, K.; Pasma, J.M.; Kinross, J.; Wahl, E. y Ruder, E. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat. Commun.* 2015, 6, 6342.
- Orth RA y Bushuk W, 1972. A comparative study of proteins of wheats of diverse baking quality. *Cereal Chemistry*, 49: 268-275.
- Osborne BG, Anderssen RS y Huynh HN, 2005. In situ measurement of the rheological properties of wheat and barley grain using the SKCS 4100. In: Cauvain, S.P., Salmon, S.S., Young, L.S. (Eds.), *Usin Cereal Science and Technology for the Benefit of Consumers. Proceedings of the 12th International ICC Cereal and Bread Congress, Harrogate, UK, 23–26 May 2004*, pp. 207–211.

- Osborne BG, Henry R y Southan MD, 2006. Assessment of commercial milling performance of hard wheat by measurement of the rheological properties of whole grain. *Journal of Cereal Science*,23-659.
- Osborne TB, 1907. Proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution Washington, 84: 1-119.
- Overstreet A-M. 2012. The Role of the Microbiota in Gastrointestinal Health and Disease. In Szabo I. ed; *Inflammatory Bowel Disease*. InTech.
- Palframan R., Gibson, G.R. y Rastall, R.A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 281–284.
- Pan MH, Lai CS, Wu JC y Ho T. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds, *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (2011) 32–45.
- Panozzo JF, Hannah MC, O'Brien L y Bekes F, 1993. The relationship of free lipids and our protein to breadmaking quality. *Journal of Cereal Science* 17 47±62.
- Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR y McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 10):987–91.
- Pärtty A, Kalliomäki M, Wacklin P y Salminen S. 2015. A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. *Pediatr. Res.* 77: 823–8.
- Pearson T, Wilson J, Gwirtz J, Maghirang E, Dowell F y McCluskey P, 2007. Relationship between single wheat kernel particle-size distribution and Perten SKCS 4100 hardness index. *Cereal Chemistry*, 84: 567-575.
- Pedreschi R., Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., y Cisneros-Zevallos, L. (2003). Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5278e5284.
- Peng M., Gao M., Abdel-Aal E.-S. M., Hucl P. and Chibbar R. N. 1999. Separation and characterization of A- and B-type starch granules in wheat endosperm. *Cereal Chemistry* 76: 375-379.
- Petrosino JF, Highlander S y Luna RA. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem* 2009;55:856---66.
- Pirini M, Manuzzi MP, Pagliarani A, Trombetti F y Ventrella V, 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 147, Issue 4, August 2007, Pages 616-626.
- Pomare E., Branch W. y Cummings J. Carbohydrate Fermentation in the Human Colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J Clin Invest.* 1985;75(5):1448-1454. <https://doi.org/10.1172/JCI111847>.

- Posner ES y Hibbs AN, 2005. Wheat flour milling. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Pozzo-Miller L, Pati S y Percy AK. Rett Syndrome : Reaching for Clinical Trials. *Neurotherapeutics*. 2015;12(3):631–40.
- Prabhasankar P and Rao PH, 2001. Effect of different milling methods on chemical composition of whole wheat flour. *European Journal of Food Research and Technology*, 213, 465e469.
- Pryde S., Duncan S., Hold G., Stewart C. y Flint H. *The Microbiology of Butyrate* Publishers; 1999. p 37-53.
- Qin J, Li R, y Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59--65.
- Ragae S y Abdel-Aal ESM, 2006. Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chemistry* 95(1): 9-18.
- Ragae S., Abdel-Aal, E.-S. M. and Noaman, M. 2006. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry* 98:32-38.
- Ragae S., Guzar, I., Dhull, N. and Seetharaman, K. 2011. Effects of fiber addition on antioxidant capacity and nutritional quality of wheat bread. *LWT-Food Science and Technology* 44:2147-2153.
- Rajamanickam S y Agarwa R. Natural Products and Colon Cancer: Current Status and Future Prospects. *Drug Development reserch* 69: 460–471 (2008).
- Ram S y Singh SP, 2004. Solvent retention capacities for Indian wheats and their relationship with cookie making quality. *Cereal Chemistry*, 81:128-133.
- Reis S.F., Coelho E., Coimbra M.A. y Abu-Ghannam N. Influence of grain particle sizes on the structure of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Carbohydrate Polymers* 130 (2015) 222–226.
- Rhee S.H.; Pothoulakis, C.y Mayer, E.A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2009, 6, 306–314.
- Ricceri L, Filippis B De, Laviola G. Mouse models of Rett syndrome : from behavioural phenotyping to preclinical evaluation of new therapeutic approaches. *Behav Pharmacol.* 2007;19((5-6)):501–517.
- Rinttilä T, Lyra A, Krogius-Kurikka L y Palva A. 2011. Real-time PCR analysis of enteric pathogens from fecal samples of irritable bowel syndrome subjects. *Gut Pathog.* 3: 6.
- Rivière A., Moens, F., Selak, M., Maes, D., Weckx, S. y De Vuyst, L. (2014). The Ability of Bifidobacteria To Degrade Arabinoxylan Oligosaccharide Constituents and Derived Oligosaccharides Is Strain Dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 204–217.
- Roberfroid M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *The American Society for Nutrition.* 137: 830S-837S.
- Roberfroid M., Van Loo J. y Gibson G. The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and its Hydrolysis Products. *The Journal of Nutrition* 1998; 128(1) 11-19.

- Roberfroid, MB, ed. *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. Boca Raton: CRC Press; 2005.
- Robert C., y Bernalier-Donadille, A. (2003). The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *FEMS Microbiology Ecology*. 46: 81-89.
- Roberts VHJ, Frias AE y Grove KL. Impact of Maternal Obesity on Fetal Programming of Cardiovascular Disease. *Physiology*. 2015 May;30(3):224–31.
- Rosa-Sibakov N., Poutanen, K., y Micard, V. (2015). How does wheat grain, bran and aleurone structure impact their nutritional and technological properties? *Trends in Food Science & Technology*, 41(2), 118–134.
- Rose D. J., Patterson, J. A., y Hamaker, B. R. (2010). Structural differences among alkali-soluble arabinoxylans from maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*), and wheat (*Triticum aestivum*) brans influence human fecal fermentation profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 493–499.
- Rubel I.A., Pérez, E.E., Genovese, D.B. y Manrique, G.D. (2014). In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. *Food Res. Int.* 62, 59–65.
- Ruiz Alvarez V. Puig Pena Y. y Rodríguez Acosta M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana Invest Biomed.* 2012:29.
- Rumpagaporn P., Reuha B. L., Kaur A., Patterson J.A, Keshavarzian A. y Hamaker B. R. Structural features of soluble cereal arabinoxylan fibers associated with a slow rate of in vitro fermentation by human fecal microbiota. *Carbohydrate Polymers* 130 (2015) 191–197.
- Rycroft C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 878–887.
- Saad N., Delattre C., Urdaci M. y Schmitter J., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Sci. Technol.* 50: 1–16.
- Salvador V, Cherbut C, Barry JL, Bertrand D, Bonnet C y Delort-Laval J, Sugar composition of dietary fiber and short chain fatty acid production during in vitro fermentation by human bacteria. *Br J Nutr* 70:189±197 (1993).
- Salvucci E. (2016). Microbiome, holobiont and the net of life. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 485–494. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.962478>.
- Samuelsen A. B., Rieder, A., Grimmer, S., Michaelsen, T. E., y Knutsen, S. H. (2011). Immunomodulatory activity of dietary fiber: arabinoxylan and mixed-linked Beta-glucan isolated from barley show modest activities in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 570e587.
- Sánchez MG, 2005. Síndrome de Prune-Belly o abdomen en “ciruela pasa”. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, Volume 12, Issue 7.

- Santacruz A., Marcos A., Wärnberg J., Martí A., Martín-Matillas M., Campoy C. Moreno L. A., Veiga O., Redondo-Figuero C., Garagorri J. M., Azcona C., Delgado M., García-Fuentes M., Collado M. C. y Sanz Y. 2009. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity* 17:1906-1915.
- Saulnier L., Sado, P.-E., Branlard, G., Charmet, G. y Guillon, F. (2007). Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J. Cereal Sci., The Contribution of Cereals to a Healthy Diet* 46, 261–281.
- Savignac H.M., Kiely B., Dinan T.G. y Cryan J.F. 2014. Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 26: 1615–27.
- Schaub B, Liu J, Höppler S, Schleich I, Huehn J y Olek S. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):774-782.e5.
- Schofield JD, 1994. WHEAT Production, Properties and Quality. Ed. Bushuk W, Rasper VF. 1° ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK. 73–99.
- Schooneveld-Bergmans M.E.F., Beldman, G. y Voragen, A.G.J. Structural features of (glucurono) arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. *Journal of Cereal Science* 29 (1999) 63–75.
- Schottelius AJ y Dinter H. Cytokines, NF-κB, microenvironment, intestinal inflammation and cancer, *Cancer Treat. Res.* 130 (2006) 67–87.
- Severance E.G., Yolken R.H. y Eaton W.W. 2014. Autoimmune diseases, gastrointestinal disorders and the microbiome in schizophrenia: more than a gut feeling. *Schizophr. Res.*
- Severson CA, Wang W, Pieribone VA, Dohle CI, Richerson GB: Mid brain serotonergic receptors neurons are central pH chemoreceptors. *Nat Neurosci* 2003, 6:1139.
- Shahbazian M.D., Young J.I., Yuva-Paylor L.A., Spencer C.M., Antalfy B.A. y Noebels J.L. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron.* 2002;35(2):243–54.
- Shanahan F, Nally K y Dougan G. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(6):2108–13.
- Shao P, Liu J, Chen X, Fang Z y Sun P. Structural features and antitumor activity of a purified polysaccharide extracted from *Sargassum horneri*, *Int. J. Biol. Macromol.* 73 (2015) 124–130.
- Shewry PR, Piironen V, Lampi AM, Edelmann M, Kariluoto S, Nurmi T, Fernandez-Orozco R, Ravel C, Charmet G, Andersson AM, Aman P, Boros D, Gebruers K, Dornez E, Courtin CM, Delcour JA, Rakszegi M, Beso Z y Ward JL, 2010. The HEALTHGRAIN wheat diversity screen: Effects of genotype and environment on phytochemicals and dietary fiber components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(17): 9291-9298.
- Shibamura K., Takeda Y., Hizukuri S. and Shibata S. 1994. Molecular structures of some wheat starches. *Carbohydrate Polymers* 25: 111-116.

- Shin H.Y., Lee J.H, Lee J.Y., Han Y.O., Han M.J. y Kim D.H. Purification and characterization of ginsenoside Ra-hydrolyzing b-D-xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003a) 1170–1173.
- Shin S.Y. Park, J.H. Sung, D.H. y Kim, S. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-arabinopyranosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb<sub>2</sub> and Rc, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003b) 7116–7123.
- Shinde S. V., Nelson J. E. and Huber K. C. 2003. Soft wheat starch pasting behavior in relation to A- and B-type granule content and composition. *Cereal Chemistry* 80: 91-98.
- Signorini C.; de Felice, C.; Leoncini, S.; Durand, T.; Galano, J.M.; Cortelazzo, A.; Zollo, G.; Guerranti, R.; Gonnelli, S. y Caffarelli, C. Altered erythrocyte membrane fatty acid profile in typical Rett syndrome: Effects of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid supplementation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 2014, 91, 183–193.
- Simren M., Barbara G., Flint H.J., Spiegel B.M., Spiller R.C. y Vanner, 2013. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report. *Gut*;62:159---76.
- Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(11):6459–65.
- Souza E, Kruk M y Sunderman DW, 1994. Association of sugarsnap cookie quality with high molecular weight glutenin alleles in soft white spring wheats. *Cereal Chemistry*, 71: 601-605.
- Strati F.; Cavaliere, D.; Albanese, D.; de Felice, C.; Donati, C.; Hayek, J.; Jousson, O.; Leoncini, S.; Pindo, M. y Renzi, D. Altered gut microbiota in Rett syndrome. *Microbiome* 2016, 4, 41.
- Sun S, Sun D y Wang X. Effects of *Scutellaria barbata* polysaccharide on the proliferation, apoptosis and EMT of human colon cancer HT29 cells, *Carbohydr. Polym.* 167 (2017) 90–96.
- Sutton KH, Simmons LD. 2006. Molecular level protein composition of flour mill streams from a pilot-scale flour mill and its relationship to product quality. *Cereal Chemistry*, 83: 52-56.
- Swanston J.S., Smith P.L., Agu R.C., Brosnan J.M., Bringhurst T.A. y Jack F.R. Variation, across environments within the UK, in grain protein and grain hardness, in wheat varieties of differing distilling quality. *Field Crops Research* 127 (2012) 146–152.
- Symons F.J.; Byiers, B. y Tervo, R.C.; Beisang, A. Parent-reported pain in Rett syndrome. *Clin. J. Pain* 2013, 29, 744–746.  
Syndr [Internet]. 2015 Sep 12;7. Available from:
- Tabbaa M.; Golubic, M.; Roizen, M.F. y Bernstein, A.M. Docosahexaenoic acid, inflammation, and bacterial dysbiosis in relation to periodontal disease, inflammatory bowel disease, and the metabolic syndrome. *Nutrients* 2013, 5, 3299–3310.

- Tak PP y Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 7–11.
- Tarquinio D.C., Hou W., Neul J.L., Kaufmann W.E., Glaze D.G., Motil K.J., Skinner S.A. y Lee H.S. The changing face of survival in Rett syndrome and MECP2- related disorders. *Pediatr Neurol.* 2015;53(5):402–11.
- Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K y Ostatnikova D. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia, *Physiol. Behav.* 138 (2015) 179e187.
- Topping D. y Clifton P. Short-chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews* 2001; 81(3)1031-1063.
- Tremaroli V. y Backhed, F. (2012). Functional interactions between the gutmicrobiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242–249.
- Trowell H, Southgate DAT, Wolever TMS, Leeds AR, Gassull MA y Jenkins DJA, 1976. Dietary fiber redefined. *Lancet* 1: 967-967.
- Turnbaugh P.J., Ridaura V.K. y Faith J.J., 2009.The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnoto biotic mice. *Sci Trans I Med*; 1:6ra14
- Turrone F.; Ribbera, A.; Foroni, E.; van Sinderen, D. y Ventura, M. Human gut microbiota and bifidobacteria: From composition to functionality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008, 94, 35–50.
- Urushiyama D, Suda W, Ohnishi E, Araki R, Kiyoshima C y Kurakazu MI. Microbiome profile of the amniotic fluid as a predictive biomarker of perinatal outcome. *Sci Rep.* 2017 Sep 22;7(1):12171.
- Van Craeyveld V., Swennen K., Dornez E., Van de Wiele T., Marzorati M., Verstraete W., Delaedt Y., Onagbesan O., Decuyper E., Buyse J., De Ketelaere B., Broekaert WF., Delcour JA. y Courtin CM. Structurally Different Wheat-Derived Arabinoxyloligosaccharides Have Different Prebiotic and Fermentation Properties in Rats. 0022-3166/08 \$8.00 a 2008 American Society for Nutrition.
- Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H y Verstraete W. Inulintype fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol.* 2007;102:452–60.
- Van den Abbeele P., Gérard, P., Rabot, S., Bruneau, A., El-Aidy, S., Derrien, M. y Possemiers, S. (2011). Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environmental Microbiology.* 13(10): 2667-2680.
- Van der Meulen T.A., Harmsen, H., Bootsma, H., Spijkervet, F., Kroese, F. y Vissink, A. (2016). The microbiome-systemic diseases connection. *Oral Dis.* 22, 719–734.<https://doi.org/10.1111/odi.12472>.

- Van Laar H., Tamminga, S., Williams, B. A., Verstegen, M. W. A., y Schols, H. A. (2002). Fermentation characteristics of polysaccharide fractions extracted from the cellwalls of maize endosperm. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(12),1369–1375.
- Van Laere C.H.L. Voragen, T. Kroef, L.A.M. van den Broek, G. Beldman y Voragen A.G.J, Purification and mode of action of two different arabinoxylan arabinofuranohydrolases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 606–613.
- Van Loo J., Coussement P., De Leenheer L., Hoebregs H. y Smits G. On the Presence of Inulin and Oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol 35, 1995 - Issue 6.
- Vandenplas Y., Huys G. y Daube G. 2015. Probiotics: an update. *J. Pediatr. (Rio J.)* 91: 6–21.
- Vardakou M, Palop CN, Gasson M, Narbad A y Christakopoulos P. In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. *Int J Biol Macromol.* 2007;41:584–9.
- Vardakou, M., Palop, C. N., Christakopoulos, P., Faulds, C. B., Gasson, M. A., y Narbad, A. (2008). Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. *International Journal of Food Microbiology.* 123(1): 166-170.
- Venter C., Vorster H. y Cummings J. Effects of Dietary Propionate on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Healthy Volunteers. *American Journal of Gastroenterology* (1990). Vol 85 issue 5. p 549-553.
- Veraverbeke WS y Delcour JA, 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Food Science and Nutrition*, 42: 179–208.
- Vernazza C.L., Gibson, G.R., & Rastall, R.A. (2005). In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human faecal bacteria. *Carbohydr. Polym.* 60, 539–545.
- Vignola MB, 2017. Tesis Doctoral Influencia del genotipo y el ambiente sobre la variabilidad de la calidad tecnológica y nutricional de cultivares de trigo. Cambios en la calidad nutricional debidos al procesamiento. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.
- Vignola MB, Moiraghi M, Salvucci E, Baroni V y Perez GT. Whole meal and white flour from Argentine wheat genotypes: Mineral and arabinoxylan differences. *Journal of Cereal Science* 71 217-223.
- Viladomiu M, Hontecillas R, Yuan L, Lu P y Bassaganya-Riera J (2013) Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *J Nutr Biochem* 24: 929-939.
- Vincent TL y Gatenby RA. 2008. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol* 32:729–737.
- Vocke G, Buzby JC y Wells HF, 2008. Consumer preferences change wheat flour use. *Amber Waves* 6, 2.

- Wallace T.D., Bradley S., Buckley N.D. y Green-Johnson J.M., 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *J Food Prot*; 66:466---72.
- Wang J., Sun, B., Cao, Y., y Wang, C. (2010). In vitro fermentation of xylooligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber by Bifidobacteria. *Carbohydrate Polymers*, 82, 419e423.
- Wang R, Zhou W, Yu HH y Chow WF, 2006. Effects of green tea extract on the quality of bread made from unfrozen and frozen dough processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 857–864.
- Wang Y y Kasper LH. 2014. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain. Behav. Immun.* 38: 1–12.
- Whilster R. and Daniel J. 1984. Molecular structure of Starch. En: *Starch Chemistry and Technology*. Whilster R., BeMiller J., Paschal E. (eds.). Academic Press. NY. EUA. pp. 153-182.
- Whitman W. B., Coleman, D. C. y Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6578–6583. doi: 10.1073/pnas.95.12.6578.
- Williams MT y Hord NG. 2005. The role of dietary factors in cancer prevention: beyond fruits and vegetables. *Nutr Clin Pract* 20:451–459.
- Wong RD, Russell de Souza, RD, Cyril W. C. Kendall, Azadeh Emam, MS, y David J. A. Jenkins, MD. *Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids*. *J Clin Gastroenterol* Volume 40, Number 3.
- Wu GD, Chen J y Hoffmann C. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105-108.
- Yamada H., K. Itoh, Y. y Morishita, H. Taniguchi, *Cereal Food World* 38 (1993) 490–492. R. Crittenden, S. Karppinen, S. Ojanen, M. Tenkanen, R. Fagerstrom, J. Matto, J. *Sci. Food Agric.* 82 (2002) 781–789.
- Yang J. Influence of Dietary Fiber and Whole Grains on Fecal Microbiota During in vitro Fermentation. University of Nebraska. Dissertations, Theses, & Student Research in Food Science and Technology Department.
- Young D.J., Bebbington A., Anderson A., Klerk N. De Kaufmann W.E. y Leonard H. The diagnosis of autism in a female: could it be Rett syndrome? *Eur J Pediatr.* 2008;167(6):661–9.
- Yu G, Huang B, Chen G y Mi Y. Phosphatidylethanolamine-binding protein 4 promotes lung cancer cells proliferation and invasion via PI3K/Akt/mTOR axis, *J. Thorac. Dis.* 7 (2015) 1806–1816.
- Zhang D y Moore WR, 1997. Effect of Wheat Bran Particle Size on Dough Rheological Properties. *J Sci Food Agric* 74, 490–496.
- Zhang D y Moore WR, 1999. Wheat bran particle size effects on bread baking performance and quality. *J Sci Food Agric* 79:805±809.

- Zhang N., Huang, X., Zeng, Y., Wu, X. y Peng, X. (2013). Study on prebiotic effectiveness of neutral garlic fructan in vitro. *Food Sci. Hum. Wellness* 2, 119–123.
- Zhao G, M. Nyman, J. Jonsson, Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified waterextraction and direct-injection gas chromatography, *Biomed. Chromatogr.*20 (2006) 674e682.
- Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Mao L, Yu M y Xu J. The Placental Microbiota Is Altered among Subjects with Gestational Diabetes Mellitus: A Pilot Study. *Front Physiol.* 2017; 8:675.
- Zhou Q, Li X, Yang J, Zhou L, Cai J, Wang X, Dai T, Cao W y Jiang D (2016). Spatial distribution patterns of protein and starch in wheat grain affect baking quality of bread and biscuit. *Journal of Cereal Science* S0733-5210(16)30353.