

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son un problema de salud pública a nivel mundial, estas comparten características en relación a cambios en la microbiota asociados con un incremento de la permeabilidad del epitelio intestinal [1]. Por otro lado, Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, contribuyen al desarrollo normal y mantenimiento del epitelio y del sistema inmune del intestino. Además, está claramente establecido que los AGCC son el principal vínculo entre la dieta [2], la microbiota y el estado de salud de los individuos, por lo que en el presente trabajo se pretende construir una cepa probiótica de *Saccharomyces boulardii* productora de butirato, y evaluar el efecto de esta sobre la estructura, permeabilidad y función del epitelio intestinal a través de un modelo *in vitro* de cultivo celular dual de células epiteliales, monocitos/macrófagos

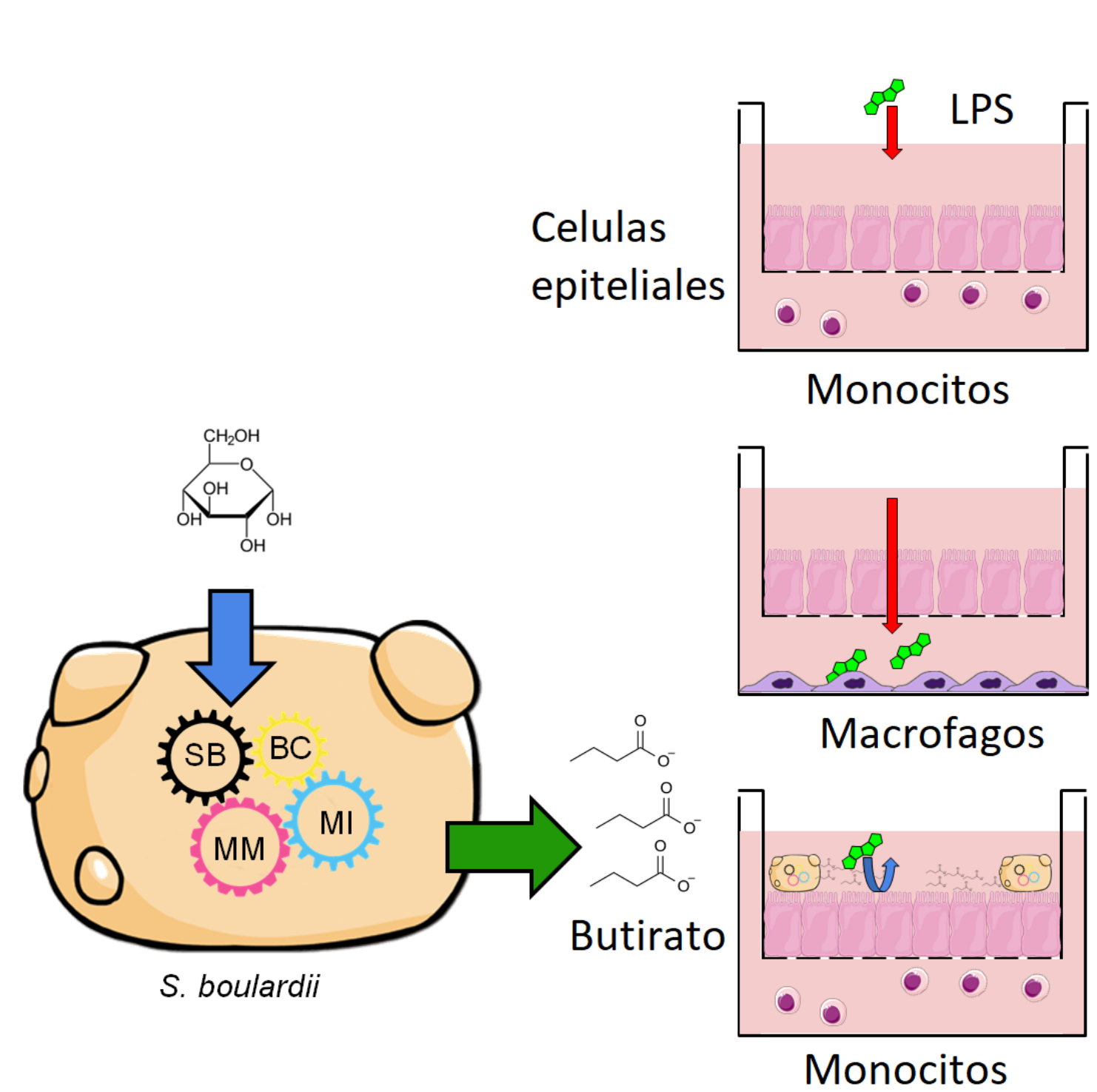
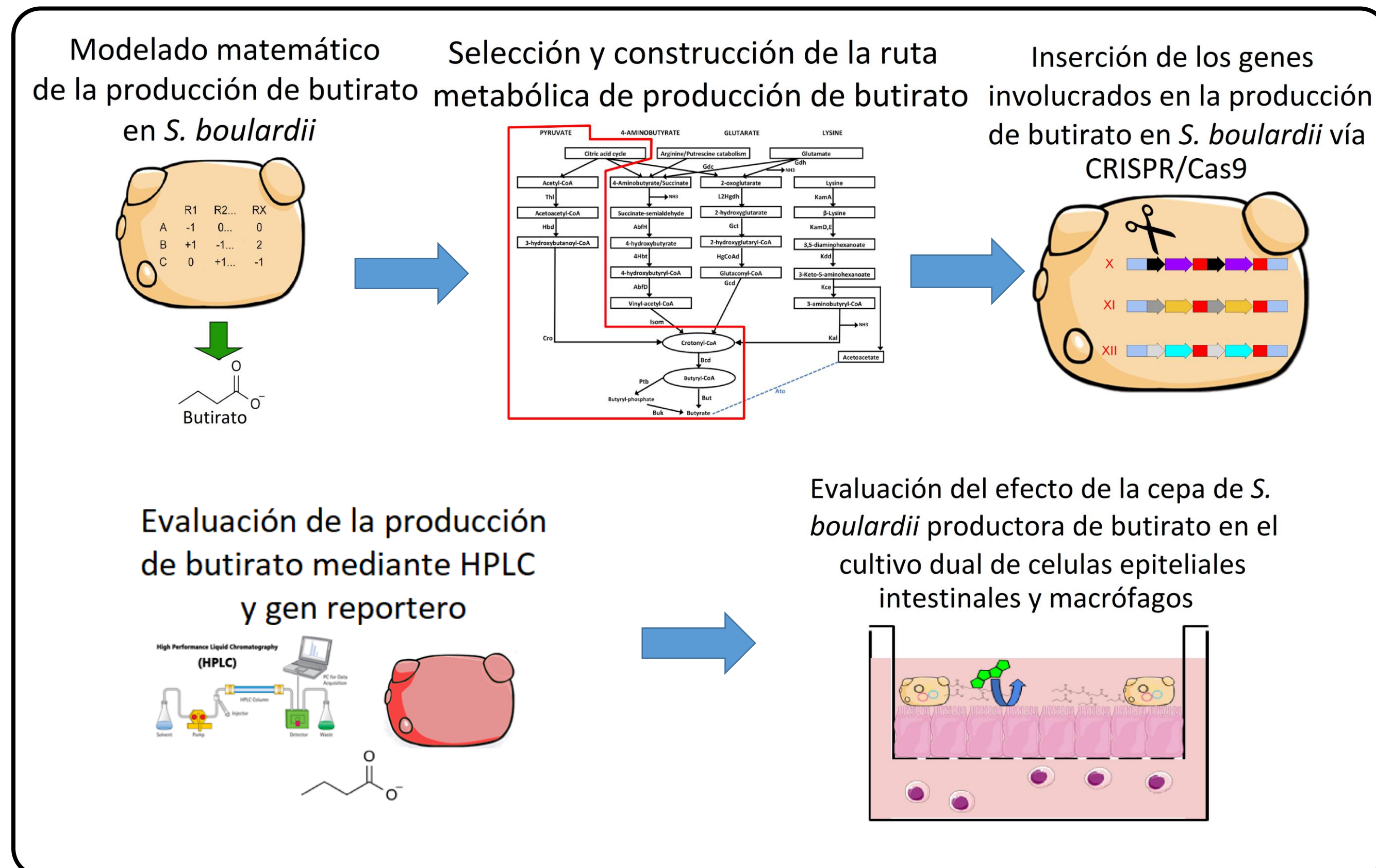


Figura 1. Evaluación del efecto de la cepa de *Saccharomyces boulardii* en la estructura, permeabilidad y función de las líneas celulares epiteliales, en co-cultivo con monocitos

## METODOLOGÍA



## RESULTADOS

### MODELADO MATEMÁTICO DE LA PRODUCCIÓN DE BUTIRATO EN *S. boulardii*

Se evaluó cuatro distintas rutas metabólicas (módulos) de producción de butirato en un modelo matemático del metabolismo de *S. cerevisiae*, y se evaluó cuál de los cuatro módulos optimiza la producción de butirato y biomasa, variando parámetros de cantidad de glucosa y oxígeno

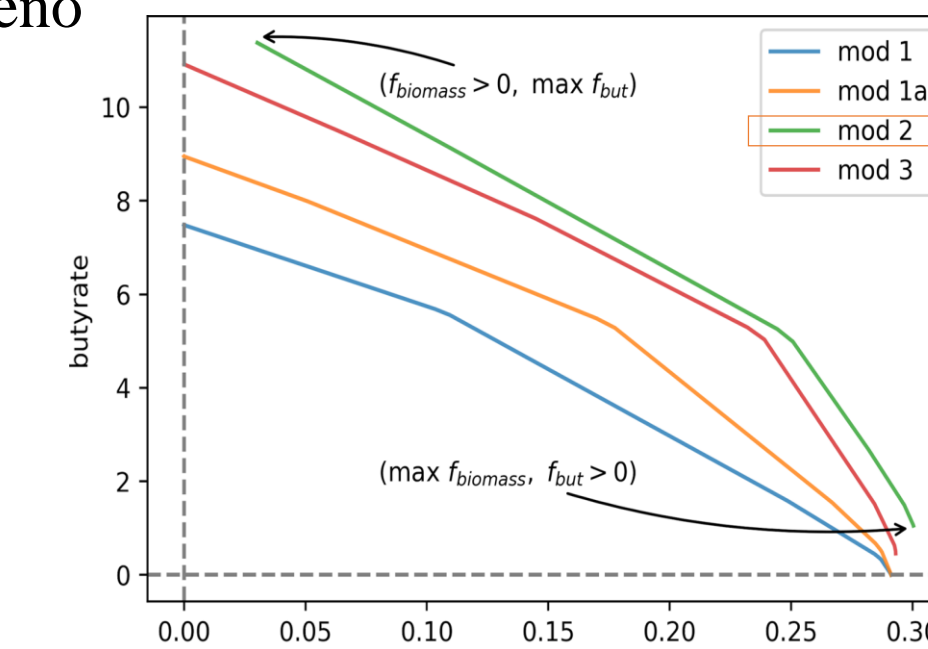


Figura 2. Cantidad de butirato producida de cada módulo teórico (mmol/h) en relación a la cantidad de biomasa producida (1/h)

Ruta metabólica seleccionada: Módulo 2

Figura 3. Cantidad de butirato y biomasa producida para cada uno de los módulos teóricos en función a la concentración de Glucosa (A: cuando el modelo maximiza la producción de butirato) y Oxígeno (C: cuando el modelo maximiza la producción de biomasa y D: cuando el modelo maximiza la producción de butirato).

## 4 RESULTADOS

### CONSTRUCCIÓN DE LA RUTA METABOLICA DE PRODUCCIÓN DE BUTIRATO SELECCIONADA EN BASE AL MODELADO MATEMÁTICO

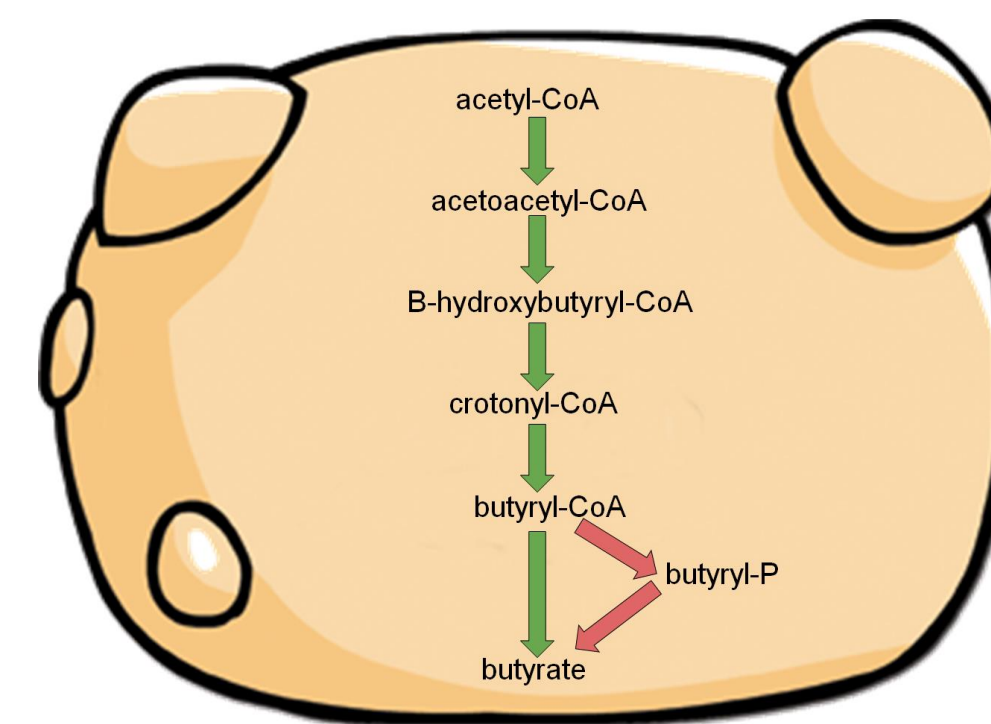


Figura 4. Ruta metabólica seleccionada para la producción de butirato en *S. boulardii*

Tabla 1. Genes, Enzimas, y reacciones involucradas en la ruta metabólica de producción de butirato

Gen	Enzima	Fuente	Reaction que cataliza
phaA	acetyl-CoA C-acetyltransferase [2.3.1.9]	<i>Capriavidus necator</i>	2 acetyl-CoA → CoA + acetoacetyl-CoA
phaB	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [1.1.1.35]	<i>Allochromatium vinosum</i>	(S)-3-hydroxybutanoyl-CoA + NAD <sup>+</sup> ↔ 3-acetoacetyl-CoA + NADH + H <sup>+</sup>
phaJ	enoyl-CoA hydratase [4.2.1.17]	<i>Aeromonas caviae</i>	(3S)-3-hydroxybutanoyl-CoA ↔ (E)-but-2-enoyl-CoA + H <sub>2</sub> O
fabV	trans-2-enoyl-CoA reductase [1.3.1.44]	<i>Treponema denticola</i>	butanoyl-CoA + NAD <sup>+</sup> ↔ (E)-but-2-enoyl-CoA + NADH + H <sup>+</sup>
ptb	phosphate butyryltransferase [2.3.1.19]	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanoyl-CoA + phosphate ↔ CoA + butanoyl phosphate
buk	butyrate kinase [2.7.2.7]	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	ATP + butanoate ↔ ADP + butanoyl phosphate

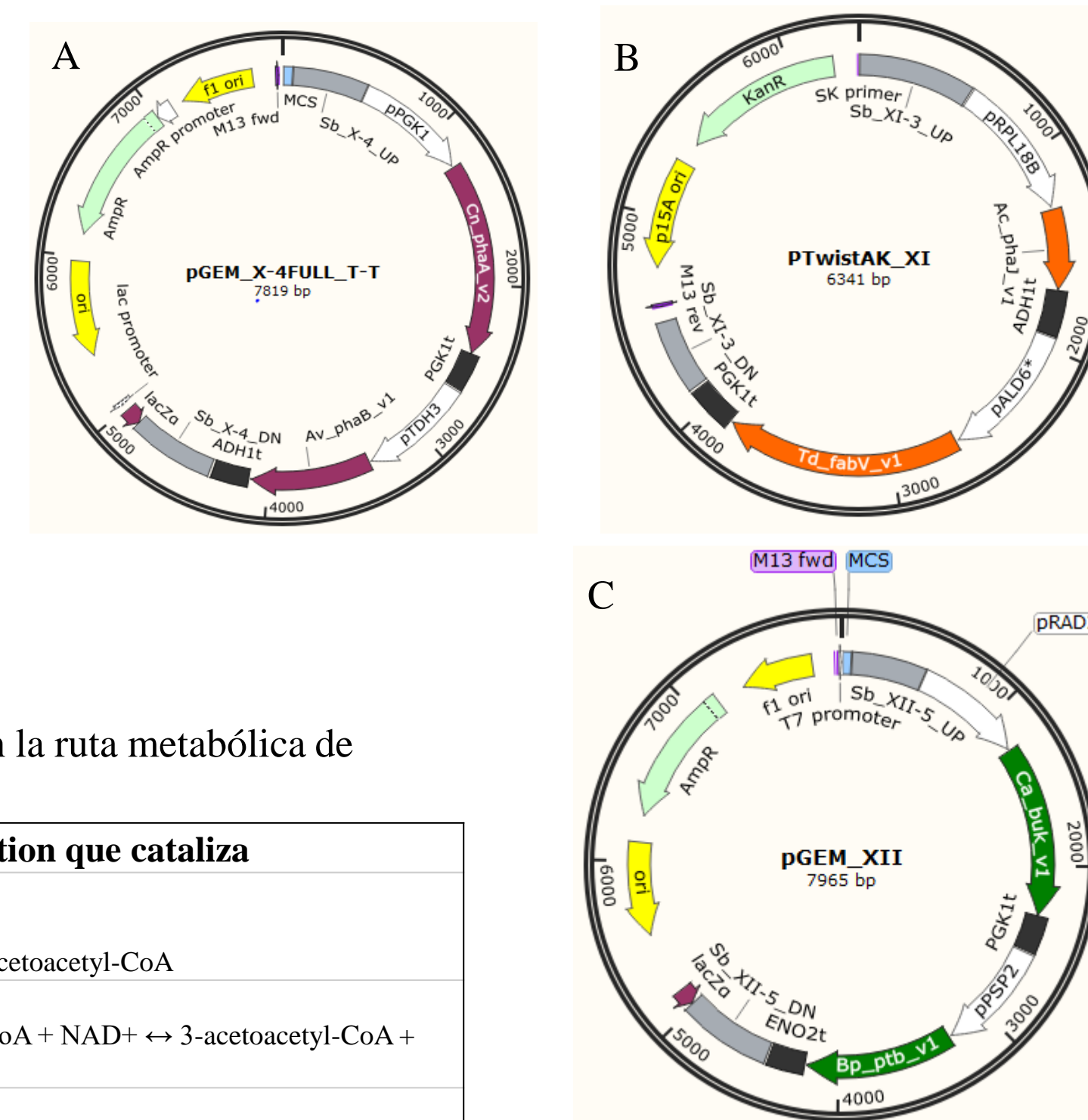


Figura 5. Vectores de clonación de los genes de producción de butirato. A) Genes phaA y phaB para integración en el cromosoma X, B) Genes phaJ y fabV para integración en el cromosoma XI. C) Genes ptb y buk para integración en el cromosoma XII

## 4 RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE BUTIRATO POR MEDIO DE UN BIOSENSOR UTILIZANDO EL GEN REPORTERO RFP



Figura 6. Esquema del biosensor de Butirato. El butirato se une al factor de transcripción War2p y este activa al promotor PDR12 que regula la expresión de la proteína reportera RFP. Este casete se construyó en el plásmido biosensor p2uDR12-RFP

Figura 7. Microscopía de fluorescencia de *S. cerevisiae* transfectada con el plásmido biosensor p2uDR12-RFP a diferentes concentraciones de butirato.

### EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL BUTIRATO Y *S. boulardii* EN LA LINEA CELULAR CACO 2

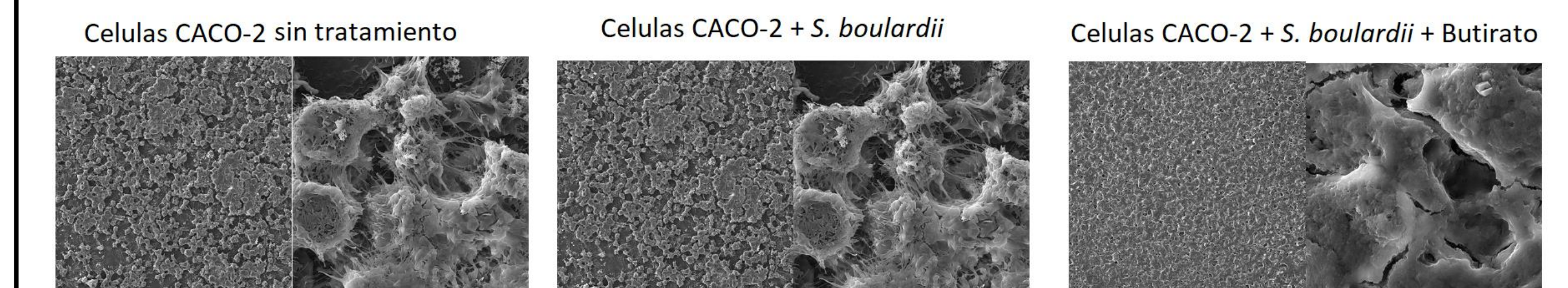


Figura 8. Microscopía electrónica del cultivo celular de la línea CACO-2 en presencia de *S. boulardii* + butirato al día 10 de cultivo. El butirato favorece a la formación de uniones estrechas entre las células, estimulando la formación de una monocapa en comparación con las células no tratadas con butirato.

## 5 CONCLUSIONES

- Se logró predecir la mejor combinación de genes para producción de butirato mediante el modelado matemático de redes metabólicas.
- El biosensor construido fue capaz de detectar la presencia de butirato.
- El butirato favorece a la formación de uniones estrechas en la línea celular CACO-2, estimulando la formación de una monocapa en comparación con las células no tratadas con butirato.

## 6 REFERENCIAS

[1] LE CHATELIER, E., NIELSEN, T., QIN, J., PRIFTI, E., HILDEBRAND, F., FALONY, G., ALMEIDA, M., ARUMUGAM, ... and PEDERSEN, O. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, vol. 500, no. 7464, pp. 541–546. DOI 10.1038/nature12506.

[2] TAN, J., MCKENZIE, C., POTAMITIS, M., THORBURN, A.N., MACKAY, C.R. and MACIA, L. 2014. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in immunology*, vol. 121, pp. 91–119. DOI 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9.