

Las investigaciones más recientes indican que la flora intestinal, también llamada microbiota intestinal, es clave en la prevención o susceptibilidad a padecer diversas enfermedades como el cáncer, el síndrome metabólico, o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Algunas bacterias del intestino son capaces de transformar los polifenoles de la dieta en compuestos beneficiosos para la salud y con actividad en la prevención de enfermedades. Este es el caso de una bacteria aislada del intestino humano perteneciente al género *Gordonibacter* que es capaz de transformar elagitaninos (ETs) presentes en la granada, nueces, castañas, fresas, frambuesas, entre otros alimentos saludables, hasta urolitinas con actividad antiinflamatoria y anti-cáncer. Sin embargo, no sabemos si dicha transformación ocurre en todos los animales a lo largo de la escala filogenética o si es un proceso adaptativo consecuencia de la alimentación u otros factores.

En colaboración con el parque de naturaleza y animales Terra Natura, se han seleccionado reptiles, aves, mamíferos, entre otros, y se han clasificado en función de su alimentación, anatomía, tipo de reproducción y hábitat. Mediante técnicas microbiológicas, cromatográficas y moleculares se ha identificado su capacidad o no de producir urolitinas y se ha valorado el papel de *Gordonibacter* en ese proceso de adaptación. Con ello, se investiga la existencia de posibles vínculos entre la evolución del ser humano y otras especies animales a través del estudio del metabolismo de los ETs y la flora intestinal.

OBJETIVOS

- Estudiar la presencia y abundancia de bacterias del género *Gordonibacter* en el intestino de distintas especies animales escogidas según su anatomía, alimentación, reproducción y hábitat.
- Estudiar la capacidad de producir urolitinas en las distintas especies animales seleccionadas realizando estudios *in vivo* e *in vitro*.
- Identificar las urolitinas producidas y sus rutas metabólicas.
- Valorar la implicación o no de *Gordonibacter* en la producción de urolitinas en las distintas especies animales estudiadas.

MATERIALES

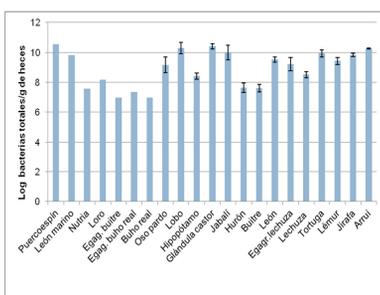
- Reactivos:**
 - Reactivos de extracción de ADN (Kit extracción del ADN)
 - Medios de cultivo microbiológicos (Agua de peptona, Nutrient Broth, Anaerobe basal Broth, Agar bacteriological)
 - Reactivos y accesorios para extracción de urolitinas (Acetato de etilo, Ácido fórmico, Filtros)
 - Reactivos y patrones para HPLC (Metanol, Ácido fórmico, Acetonitrilo, Ácido elágico)
- Equipos:** Cabina de flujo, Homogeneizador de paletas, Mezclador de vórtice, Centrifugadora, Espectrofotómetro, RT-PCR, Cabina de anaerobios, HPLC (UV-VIS), Espectrómetro de Masas (Single Quadropole), Balanza digital, Diluidor automático.
- Heces de animales**

MÉTODOS

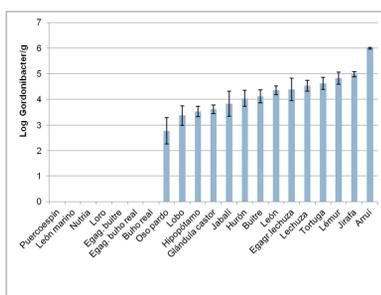
- Extracción de ADN:** Se toman alícuotas de 200 µL de heces previamente diluidas (1/10) en agua ultrapura estéril y se procede a su extracción con el PowerFecal™ DNA Isolation Kit.
- PCR a tiempo real:** Se realiza para amplificar el ADN de muestras fecales con el objetivo de cuantificar la cantidad de bacterias del *gen. Gordonibacter* presentes en cada una de ellas. Se han usado cebadores específicos de la región 16S del ARN ribosómico de *Gordonibacter*, amplificando sólo los correspondientes fragmentos de dicha región.
- Cultivos fecales:** 10 mL del homogeneizado de heces en NB en dilución 1/10 se añadieron a 50 mL de ABB que contenía ácido elágico, obteniendo una dilución final de heces en los matraces de 1/60 y una concentración de ácido elágico 25 µM. Los cultivos se incubaron en el interior de la cabina de anaerobios durante 7 días a 37 °C. En las sucesivas incubaciones se incrementó la dilución final de heces hasta 1/1000 y una concentración de ácido elágico de 30 µM.
- Extracción y purificación de metabolitos para análisis mediante HPLC:** A partir de muestras de heces y de los cultivos fecales, se procedió a la extracción y a la purificación de los metabolitos para su posterior análisis mediante HPLC.
- Análisis mediante HPLC-UV-MS:** Las muestras extraídas se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a detectores UV-VIS y espectrómetro de masas (Single-Quad) para la detección y cuantificación de urolitinas.
- Análisis estadístico y modelización de los datos:** Una vez obtenidos los resultados del presente estudio, se procedió a su representación en gráficas y tablas de Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización bacteriana

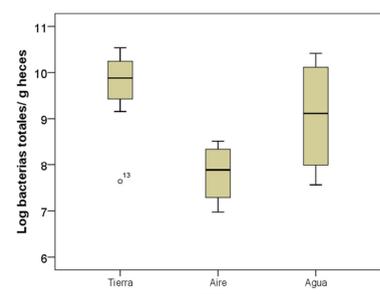


Variabilidad en la concentración de bacterias totales según la especie animal

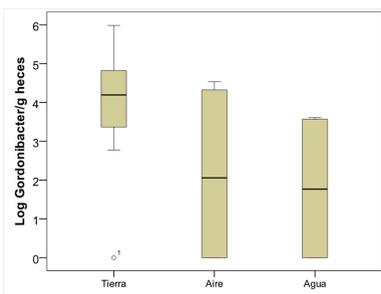


Variabilidad en la concentración de *Gordonibacter* según la especie animal

Gordonibacter está presente en el intestino de especies animales muy diferentes a lo largo de la escala filogenética sin que el hábitat, el tipo de reproducción, la anatomía o la alimentación sean una condición limitante para su presencia/ausencia.



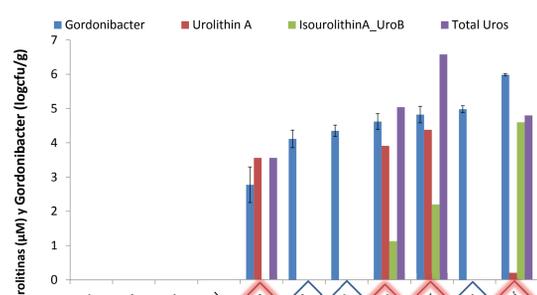
Variabilidad en la concentración de bacterias totales en animales según su hábitat



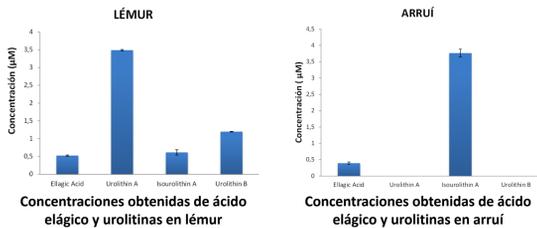
Variabilidad en la concentración de *Gordonibacter* en animales según su hábitat

La concentración de *Gordonibacter* es diferente de unas especies animales a otras y es aquí donde el hábitat o la dieta podrían tener una mayor influencia.

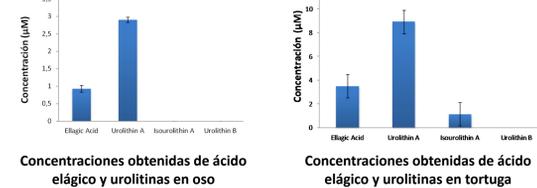
Producción *in vitro* de urolitinas



Comparativa de la concentración de *Gordonibacter* en heces de distintos animales y producción *in vitro* de urolitinas



Concentraciones obtenidas de ácido elágico y urolitinas en lémur



Concentraciones obtenidas de ácido elágico y urolitinas en tortuga

No se detectan urolitinas en: animales que no tengan *Gordonibacter*, ni en animales carnívoros, ni en aves.

Producción *in vivo* de urolitinas

Osos	Acido elágico (µg/g)	Pentahidroxiurolitina (µg/g)	<i>Gordonibacter</i> (Log bacteria/g)
Jaula 1	2,85	0	<10 ²
Jaula 2	14,70	0	<10 ²
Jaula 3	79,75	19,37	8*10 ²
Jaula 4	0	0	<10 ²
Jaula 5	7,73	0	<10 ²

Concentración (µM) de urolitinas y ácido elágico en heces de osos agrupados en jaulas (2 individuos/jaula)

Los osos pardos son capaces de producir urolitinas *in vivo*. Sin embargo, la cantidad de nueces/castañas (100 g/día) que consumieron sólo nos permitió detectar las primeras urolitinas de la ruta metabólica.

Modelo animal seleccionado: Lémur

Especie y Sexo	EA	UROLITINAS							Total
		M-5	M-6	M-7	Uro C	Uro A	Isouro A	Uro B	
Catta hembra	1,99	-	-	-	1,58	24,34	-	5,16	33,07
Catta macho 1	3,56	0,23	0,74	-	25,47	-	1,5	-	31,5
Catta macho 2	1,18	-	-	-	-	13,33	-	3,87	18,38
Catta macho 3	1,17	-	-	-	-	-	6,64	10,81	18,61
Varecia variegata hembra con todos los dedos	2,65	-	0,9	-	1,4	0,53	4,49	-	9,97
Varecia variegata hembra de cola pelada	2,06	-	-	-	0,17	-	13,15	-	15,37

Concentración (µM) de urolitinas y ácido elágico en los cultivos fecales según la especie de lémur

El lémur, por su gran capacidad para producir diversas urolitinas de la ruta metabólica, tiene un gran potencial como modelo para llevar a cabo investigaciones sobre el metabolismo de los elagitaninos, la microbiota implicada y su repercusión en procesos de salud y enfermedad. Actualmente, se usa como modelo para estudios sobre envejecimiento.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos indican que la capacidad de producir urolitinas de distintos animales dentro de la escala filogenética podría ser el resultado de una adaptación evolutiva a la alimentación. Es decir, se producen urolitinas en los seres vivos como mecanismo para adaptarse a un patrón alimentario donde los ETs están presentes (herbívoros y omnívoros). Otros factores podrían estar influyendo en esta adaptación, así por ejemplo, las aves aunque no sean carnívoras, no produjeron urolitinas.
- Gordonibacter* estuvo presente en todos los animales que producían urolitinas así como en aquellos que están o han estado expuestos a ETs en la evolución pero también en otros que no (carnívoros). Sin embargo, la co-evolución del género *Gordonibacter* en cada uno de sus hospedadores necesita procesos de adaptación diversos. Así en animales herbívoros u omnívoros potencialmente expuestos al consumo de ETs, las especies de *Gordonibacter* podrían haber adquirido la capacidad de producir urolitinas.