

Evolución de la microbiota intestinal de animales vertebrados hacia un aumento de la biodisponibilidad de polifenoles



Juan Antonio Máiquez Ceferino, Pablo Martínez Legaz y Juan Carlos Tortosa Gómez
TUTORES CEBAS-CSIC: Dra. D^a. María Victoria Selma García y Dr. D. David Beltrán Riquelme
TUTOR IES "ALCÁNTARA": D. José María Olmos Nicolás

Los elagitaninos (ETs) son polifenoles que se encuentran en granadas, fresas, frambuesas, moras, nueces. Las bacterias intestinales del género *Gordonibacter* los transforman *in vitro* hasta urolitinas que son los metabolitos que se absorben y tienen efectos en la salud humana. La capacidad de producir urolitinas es muy variable entre individuos y la concentración fecal de *Gordonibacter* se ha correlacionado con la producción *in vivo* de urolitina A. Aquellos individuos bajos o nulos productores de urolitinas no se benefician de muchos de los efectos asociados al consumo de ETs. El consumo o no de alimentos vegetales podría ser un factor determinante para dicha variabilidad pero no sabemos si es la única causa. En este trabajo, se han seleccionado como modelos de estudio distintos animales vertebrados herbívoros y omnívoros a lo largo de la escala filogenética gracias a la colaboración con el parque de naturaleza y animales Terra Natura. Se ha identificado la capacidad o no de producir urolitinas en las distintas especies animales y se ha valorado el papel de *Gordonibacter* en ese proceso de adaptación mediante técnicas metabólicas y moleculares.

OBJETIVOS

Establecer una asociación entre la producción o no de urolitinas y su microbiota intestinal en distintos animales vertebrados herbívoros:

- Estudiar la microbiota intestinal de distintas especies animales escogidas según su anatomía, alimentación, reproducción y hábitat.
- Estudiar la capacidad de producción de urolitinas en las distintas especies animales escogidas, realizando estudios *in vitro* e *in vivo*.
- Identificar las urolitinas producidas.
- Correlacionar la producción o no de urolitinas y la presencia de *Gordonibacter*.

MATERIALES

Reactivos:

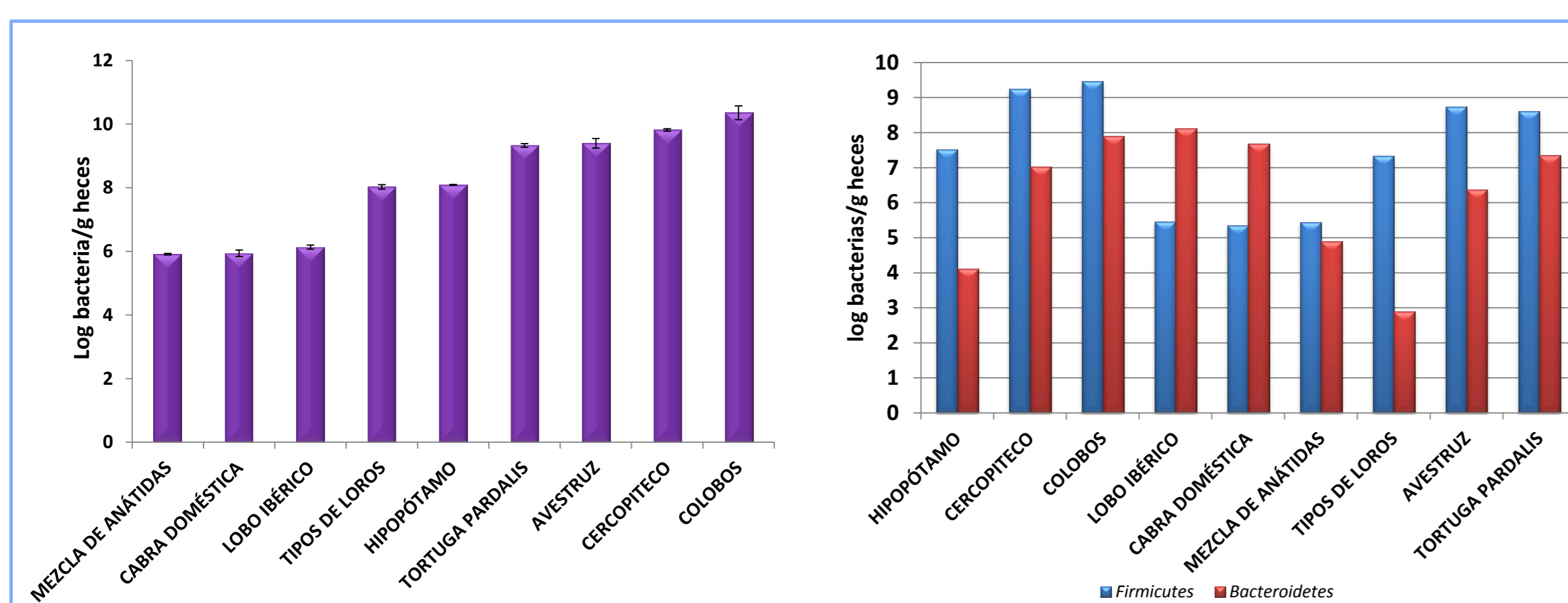
- Reactivos de extracción de ADN (Kit extracción del ADN)
- Medios de cultivo microbiológicos (Agua de peptona, Nutrient Broth, Anaerobe basal Broth, Agar bacteriological)
- Reactivos y accesorios para extracción de urolitinas (Acetato de etilo, Ácido fórmico, Filtros)
- Reactivos y patrones para HPLC (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 μ L de heces previamente diluidas (1/10) en agua ultrapura estéril y se procede a su extracción con el PowerFecal™ DNA Isolation Kit, (Mobio).
- 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 40 mL de ABB que contenía ácido elágico, obteniendo una dilución final de heces en los matraces de 1/50 y una concentración de ácido elágico 30 μ M. Los cultivos se incubaron en el interior de la cabina de anaerobios durante 7 días a 37 $^{\circ}$ C. En las sucesivas incubaciones se incrementó la dilución final de heces hasta 1/1000.
- 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

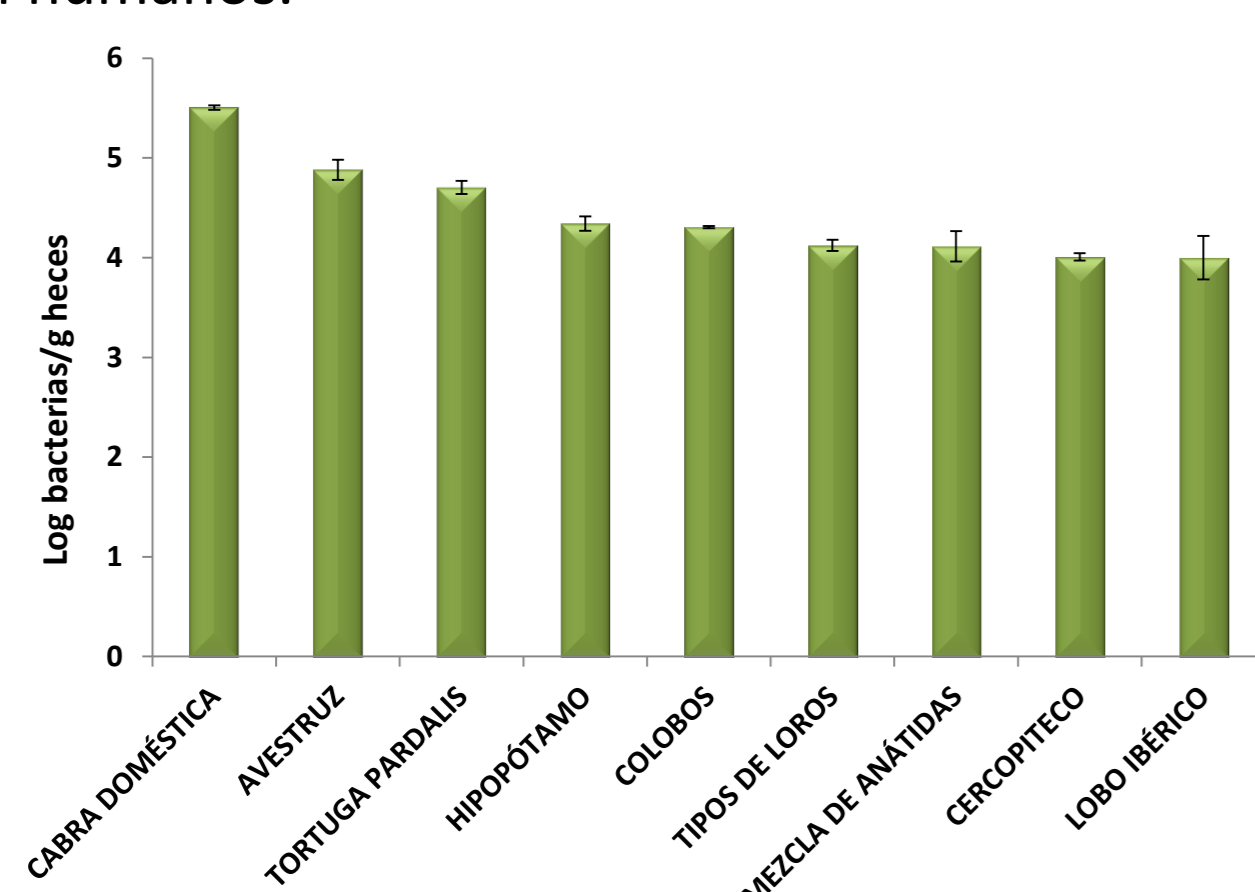
Caracterización bacteriana



Variabilidad en la concentración de bacterias totales según la especie animal

Se observa una gran variabilidad en la concentración de bacterias totales y en la concentración de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* a pesar de que las especies seleccionadas se alimentan fundamentalmente de vegetales.

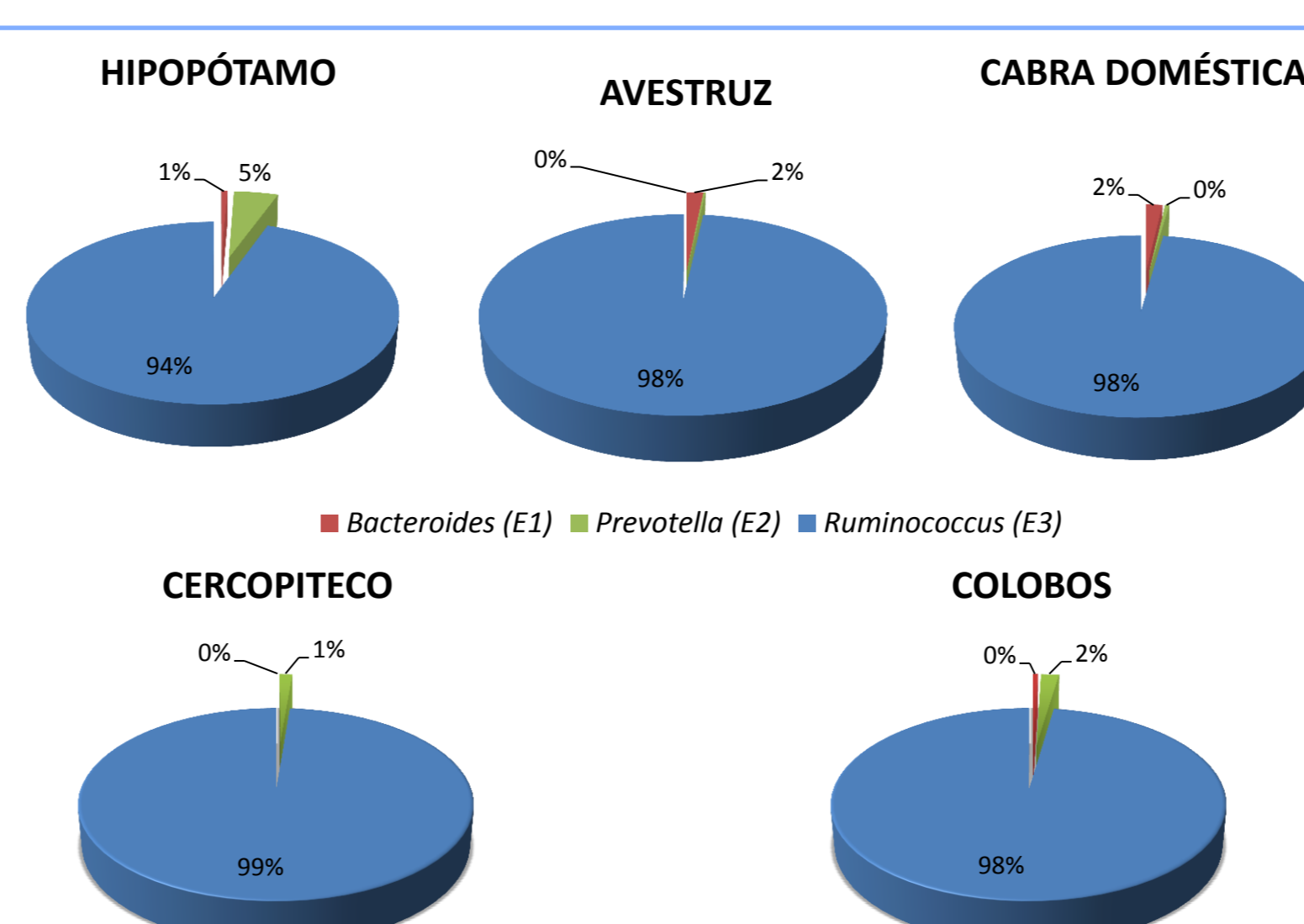
El aumento del ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* se ha relacionado con la ganancia de peso y obesidad en humanos.



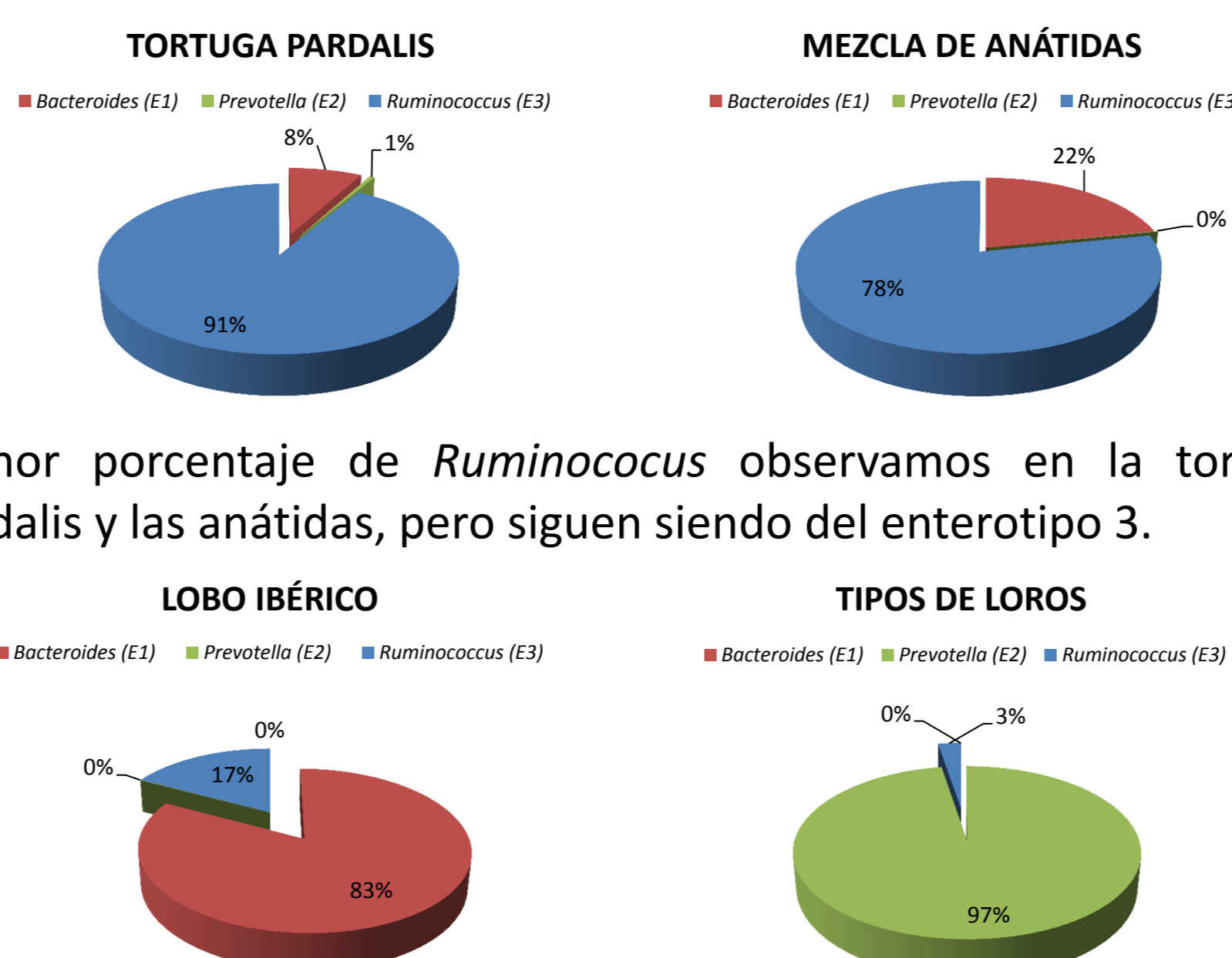
Variabilidad en la concentración de *Gordonibacter* según la especie animal

La concentración de *Gordonibacter* en heces es similar en las distintas especies animales donde el tipo de alimentación podría ser determinante ya que la mayoría de los animales seleccionados son herbívoros. La variabilidad de *Gordonibacter* es mucho mayor si se incluyen especies animales de dieta carnívoras. De hecho, en muchos animales carnívoros no se detecta *Gordonibacter*.

Enterotipos bacterianos



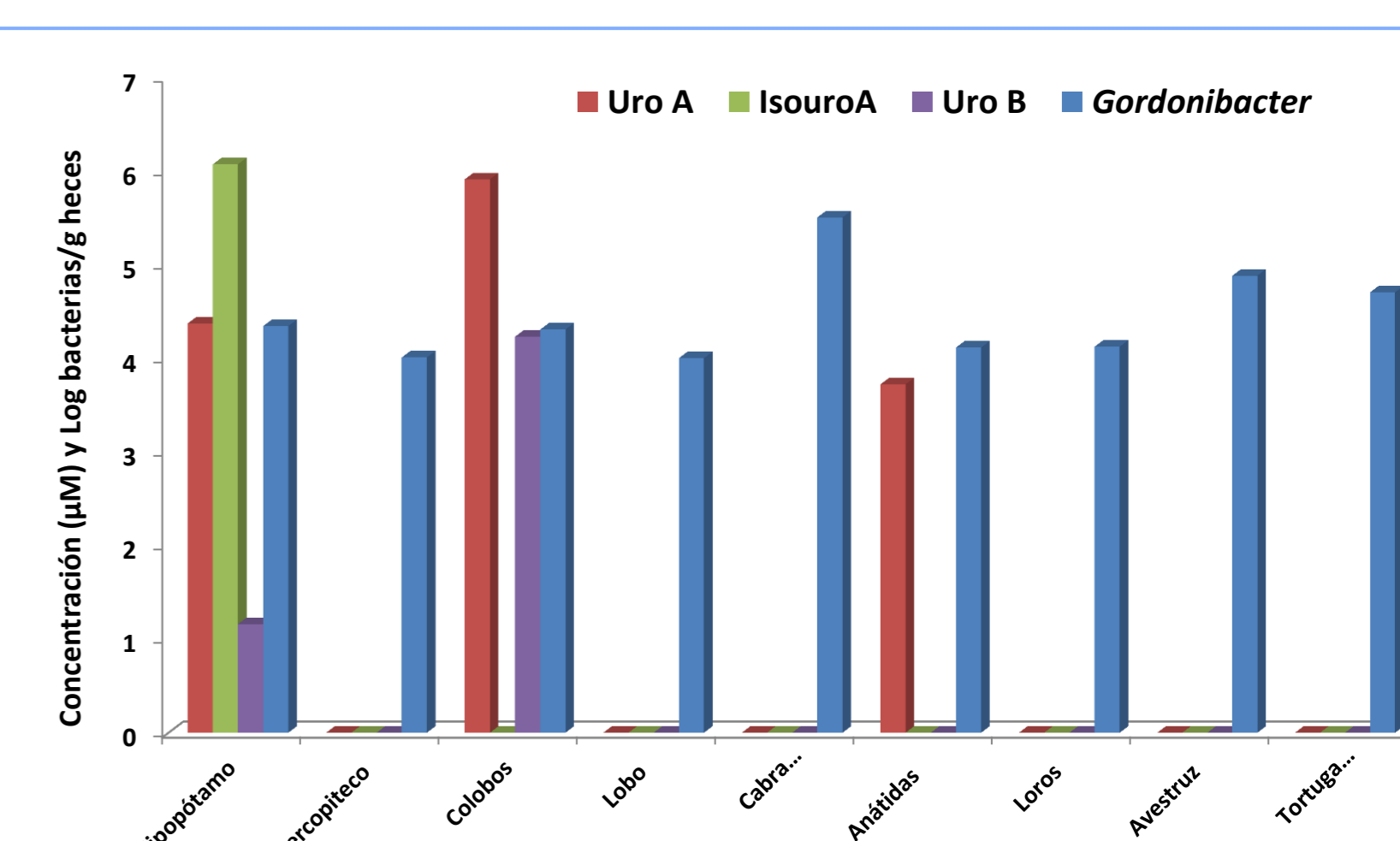
La mayoría de los animales herbívoros estudiados tienen el mismo enterotipo que la mayoría de los humanos (*Enterotipo 3*), predominando el porcentaje de *Ruminococcus* (94-98%).



Menor porcentaje de *Ruminococcus* observamos en la tortuga pardalis y las anátidas, pero siguen siendo del enterotipo 3.

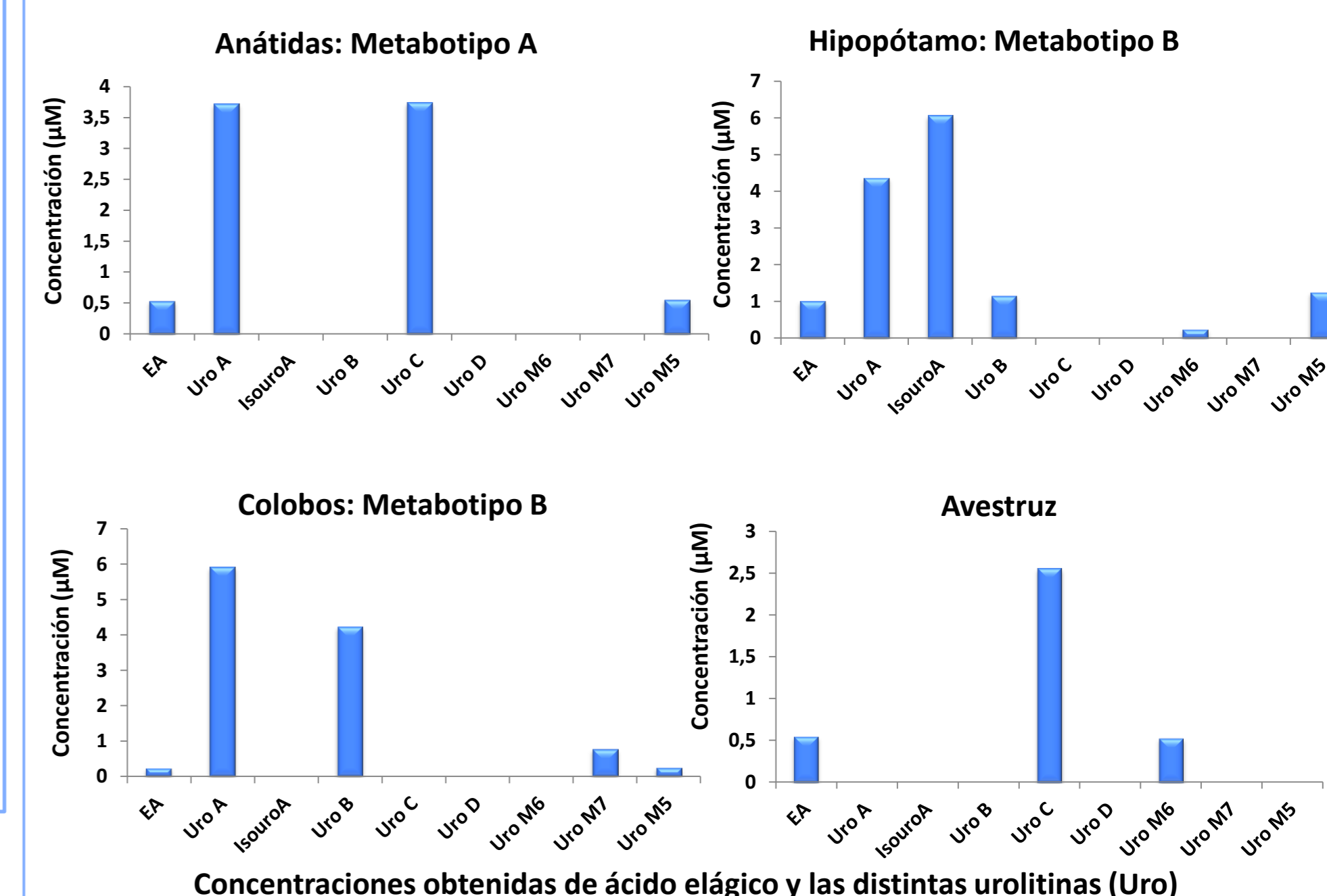
En el lobo, único carnívoro seleccionado en este estudio, predominan los *Bacteroides* (*Enterotipo 1*) y en los loros predomina *Prevotella* (*Enterotipo 2*).

Producción in vitro de urolitinas



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

Aunque todos los animales estudiados poseían concentraciones de *Gordonibacter* similares y una dieta herbívora excepto el lobo, no todos produjeron urolitinas. Comparando los resultados del presente estudio con los obtenidos recientemente, observamos que dentro de una misma familia animal unas especies producen urolitinas y otras no (colobo frente a cercopiteco; arruí frente a cabra doméstica; tortuga sulcata frente a tortuga pardalis).



Concentraciones obtenidas de ácido elágico y las distintas urolitinas (Uro)

En el presente estudio, sólo a partir de heces de hipopótamo, colobo, anátidas y avestruz se produjeron urolitinas. Por tanto, algunas aves herbívoras producen urolitinas y otras no (anátidas y avestruz frente al loro)

Producción in vivo de urolitinas

Ninguna de las tres razas de perros (**Bernés de Montaña**, **Cocker Spaniel Inglés**, **mestizo**) que consumieron nueces ha producido urolitinas. Por tanto, la domesticación de esta subespecie del lobo han sido suficientes para cambiar el metabolismo hacia la producción de urolitinas. La concentración de *Gordonibacter* estaba por debajo del límite de detección.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos indican que la capacidad de producir urolitinas no es exclusiva de los mamíferos, también las aves y reptiles pueden producirlas. Sin embargo existe variabilidad entre especies.
- La capacidad de producir urolitinas podría ser el resultado de una adaptación evolutiva a la alimentación rica en vegetales. Sin embargo, la producción de urolitinas es muy variable entre especies herbívoras. Por tanto, otros factores distintos de la alimentación están también influyendo en esta adaptación.
- Gordonibacter* está presente tanto en animales que están o han estado expuestos a elagitaninos en la evolución y en otros que no. 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 elagitaninos, las especies de *Gordonibacter* podrían haber adquirido la capacidad de producir urolitinas.



Nuestro agradecimiento al Parque de Naturaleza y Animales Terra Natura Murcia. Este estudio está financiado por el Proyecto AGL2015-73107-EXP del grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de alimentos vegetales del CEBAS-CSIC, que ha supervisado esta investigación.