

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“ESTUDIO PILOTO PARA LA
EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA
DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE
LA BILIS”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

MARTA SUÁREZ VÁZQUEZ

JULIO, 2015





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. (Universidad de Oviedo) *Sonia González Solares*

CERTIFICA:

Que Dña. Marta Suárez Vázquez ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 9ª promoción curso 2014-2015.

Oviedo, de *15* de Julio 2015

D. (Tutor) *Sonia González Solares*

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos.

A Sonia González Solares y Abelardo Margolles Barros, por ofrecerme la posibilidad de realizar este proyecto. Gracias en especial a Sonia por aceptar todos mis errores y ayudarme a corregirlos.

A Manuel Rendueles de la Vega, y a todos los profesores del Máster en Biotecnología Alimentaria, así como a mi tutor en CAPSA Amado Flórez López por aportarme nuevos e interesantes conocimientos durante todo este curso.

A mi familia, en especial a mis padres, por instarme a seguir adelante y no rendirme en los peores momentos, y a mi gato Mufi ya que la fortaleza que demostró durante los dos meses que estuvo enfermo me dio fuerzas a mí para seguir.

A mis amigos y amigas, por todos los momentos en los que me pude olvidar de todos los problemas y solo reír.

A mis alumnos y compañeros del gimnasio Universal, por aguantar mis días malos y mis días buenos.

Y a "Los Incomprendidos", por todos los ánimos y el apoyo que nos hemos dado los unos a los otros durante todo el Máster.

Índice.

Agradecimientos	pág. 2
Resumen	pág. 4
Abstract	pág. 5
Lista de figuras	pág. 6
Lista de tablas	pág. 8
Introducción	pág. 9
Antecedentes bibliográficos	pág. 13
Consideraciones teóricas	pág. 28
ARNr 16S	pág. 28
PCR cuantitativa	pág. 30
Secuenciación	pág. 31
Resultados de modelos teóricos	pág. 32
Los ácidos biliares son un factor presente en el hospedador que regula la microbiota digestiva	pág. 32
Dieta occidental, bilis y microorganismos digestivos	pág. 36
Suplementos que mejoran los cambios en la microbiota provocados por una dieta rica en grasas	pág. 38
Relación entre distintos patrones dietéticos y enterotipos	pág. 43
Conclusiones y discusión	pág. 45
Bibliografía	pág. 47

Resumen.

Tanto los microorganismos que habitan el tracto digestivo humano, como la relación de éstos con la dieta, han sido objeto de numerosos estudios de gran impacto científico durante los últimos diez años. A pesar de ello, aunque las poblaciones microbianas del estómago y del intestino han sido caracterizadas con detalle, la microbiota de la bilis y de la vesícula biliar apenas ha sido estudiada hasta ahora, debido principalmente a las dificultades que existen para acceder al material biológico, y también a la falta de técnicas moleculares adecuadas. Además, las funciones de estos microorganismos de la bilis y las características que les permiten colonizar y sobrevivir en dicho entorno, aún no han sido caracterizadas.

Existe poca información acerca de por qué una dieta rica en grasas altera la microbiota digestiva, en parte porque los investigadores han examinado un efecto "general" de la dieta más que un efecto "específico" de una dieta alta en contenido graso. Se han formulado hipótesis que consideran a los ácidos biliares como la fuerza conductora en la modificación de la microbiota digestiva en una dieta alta en grasa, aunque esto no ha sido del todo demostrado.

Con el objeto de realizar un estudio acerca de cómo influye cada tipo de dieta sobre la composición química y biológica de la bilis, se han recopilado información, datos y conclusiones en base a artículos ya publicados acerca de cómo influyen los distintos tipos de dieta en la composición de la microbiota digestiva y de los ácidos biliares.

A pesar de que aún se necesita precisar si los ácidos biliares realmente pueden ser considerados como un determinante importante a la hora de modificar la microbiota digestiva, especialmente en una dieta alta en grasas, los descubrimientos hasta ahora realizados proporcionan una nueva perspectiva para entender la etiología de las enfermedades metabólicas, incluyendo la obesidad, la enfermedad del intestino irritable y el cáncer de colon.

Abstract.

The human gut microbiota and its relationship with diet have been the subject of numerous studies that have had a huge repercussion during the last ten years. Nonetheless, although microbiologic populations from the gut and the intestine have been characterized with detail, bile microbiota has been barely studied until now, due to the difficult access that biologic material has and also the lack of molecular technics. In addition, the role of this bile microorganisms and the characteristics that make them able to survive in that environment, have not been characterized.

There is few information about why a high-fat diet alters the gut microbiota, partly because researches have tested a general effect of diet, more than an especific effect of a high-fat diet. It has been hipotesized that bile aceds are the driving force in the shift of the gut microbiota in a high-fat diet, although this has not been proved.

In order to perform a study about how each type of diet affects the chemical and biological composition of bile, information, data and conclusions have been collected from other published studies about how each different type of diet affects to the gut microbiota and to the bile acid composition.

Althoug it is still needed to precise if bile acids actually can be considered as an important determinant for the shift of gut microbiota, specially in a high-fat diet, the foreground provide a new perspective to understand the etiology of metabolic diseases, including obseity, inflamatory bowel diesase and colorectal cancer.

Lista de figuras.

Fig. 1: Estructura del ácido cólico (CA) y el ácido deoxicólico (DCA), ácidos biliares representativos encontrados en el intestino humano. - Pág. 14

Fig 2: Densidad microbiana en diferentes partes del ecosistema gastrointestinal humano. Circulación enterohepática de las sales biliares y metabolismo de estas sales llevado a cabo por la microbiota intestinal. - Pág. 16

Fig 3: Las señales de los ácidos biliares basadas en su estado de conjugación son comparadas para los ratones libres de gérmenes (GF) y los convencionales (CV) en hígado, riñón, corazón y plasma. - Pág. 17

Fig 4: Dekvota y colaboradores informan de que, en ratones, una dieta rica en grasas saturadas derivadas de la leche conllevó a un incremento en la producción de ácido taurocólico (sustancia que colabora en la digestión de las grasas) que, como consecuencia, estimuló el crecimiento de ciertos microorganismos. En ratones genéticamente susceptibles, una de estas especies (*B. wadsworthia*) desencadenó inflamación intestinal y colitis. - Pág. 20

Fig 5: La formación del 60-85% de la fosfatidilcolina en el hígado se lleva a cabo mediante la ruta de la CDP-colina. - Pág. 25

Fig 6: Estructura del ARNr 16S en la que se señalan las regiones variables más importantes. - Pág. 30

Fig 7: Efecto de la administración de CA en la composición de los ácidos biliares (A) y de los ácidos orgánicos (B) en ratas de los tres grupos diferentes (M-CA: grupo de dosis baja; H-CA: grupo de dosis alta). - Pág. 33

Fig 8: composición de la microbiota cecal (filos) de las ratas de los tres grupos según reveló la secuenciación de los genes del rRNA 16S. - Pág. 34

Fig 9: Evolución del peso corporal (A), ganancia de peso corporal (B), eficacia alimenticia (C), y peso de los tejidos adiposos visceral (D), epididimal (E), y subcutáneo (F) (porcentaje respecto al peso corporal total), de ratones alimentados con una dieta control (CT), una dieta alta en grasas (HF), y la misma dieta alta en grasas suplementada con quitina-glucano (HF-CG) durante cuatro semanas. - Pág. 39

Fig 10: Evolución del peso corporal (A), ganancia de peso corporal (B), y pesos de los tejidos adiposos visceral (C), epididimal (D) y subcutáneo (E) (porcentaje con respecto al peso corporal total) de ratones alimentados con una dieta estándar (CT), una dieta alta en grasas (HF) o la misma dieta alta en grasas suplementada con arabinoxilano (HF-AX) durante cuatro semanas. - Pág. 41

Lista de tablas.

Tabla 1: Alteraciones de la microbiota provocadas por la administración de una dieta suplementada con ácido cólico o una dieta alta en grasa. - Pág. 35

Tabla 2: porcentaje de ácidos biliares en la composición de la bilis en ratas alimentadas con una dieta control, una dieta suplementada con colina libre y otra dieta suplementada con lecitina. - Pág. 37

Introducción

En el cuerpo humano habitan de manera continua unos cien billones de microorganismos, más de diez veces el número de células humanas. Esta microbiota, constituida por bacterias, levaduras, bacteriófagos y protozoos, forma parte de un ecosistema que tiende a permanecer en un equilibrio lo más estable posible. La colonización comienza inmediatamente después del nacimiento, a partir de los microorganismos de la madre, de otras personas y de objetos del medio ambiente, y a las pocas semanas se asemeja mucho a la del adulto del mismo entorno y persiste hasta la muerte del individuo.

En contra de lo que pudiera suponerse, esta microbiota no solo no representa un peligro inmediato de infección o alteración para el sujeto normal, sino que además se considera beneficiosa. Su utilidad es notable y se manifiesta en aspectos metabólicos y de oposición al establecimiento de las bacterias exógenas que de manera continua pretenden establecerse en el mismo lugar. A esto último se le ha denominado "resistencia a la colonización", tema que ha constituido un importante paso para el entendimiento de la patogenia de la infección intestinal.

El estudio de la microbiota humana normal es, en general, complicado, ya que requiere un sistema especial de toma de muestras y el transporte en condiciones adecuadas a un laboratorio, donde se debe cuidar bien el ambiente de anaerobiosis que necesitan muchas de estas bacterias y el empleo de técnicas y medios de cultivo especiales y selectivos que permitan su individualización y contaje.

Como el organismo humano es diverso y complejo, la microbiota que se aísla en las distintas zonas y órganos es diferente; no obstante, existen una serie de características que permanecen constantes: en cada lugar en concreto solo está formada por una serie de bacterias específicas, permanentes en el tiempo y con una topografía muy estable.

El contenido de bacterias en el tramo digestivo es muy diferente en número y proporción según las partes del mismo. En condiciones normales, debido al bajo pH del jugo gástrico (0,9 a 1,5), la microbiota del estómago es mínima o apenas existente (menos de 10 bacterias por ml). La flora del intestino delgado es bastante simple, con contajes de bacterias entre 10^3 y 10^5 por mililitro, aumentando en el íleo terminal a 10^6 ,

donde *Bacteroides* y *Bifidobacterium* son los más comunes. Cuando las bacterias llegan al intestino delgado son sometidas a la acción de los jugos intestinales, pancreático y biliar, al peristaltismo y a otros factores que poseen un evidente poder antimicrobiano; por esta razón el número total de bacterias en dicho lugar es habitualmente escaso y semejante al de las partes superiores del aparato digestivo. Sin embargo, en la zona colorrectal, existen una gran cantidad de bacterias, pertenecientes a más de 500 especies distintas, capaces de utilizar los alimentos no digeridos previamente y vivir entre células epiteliales. Se puede decir que estas bacterias, una vez salvados obstáculos como pH, barrido de los cilios de la mucosa intestinal, movimientos peristálticos, descamación epitelial, defensas inmunológicas locales (IgA secretora principalmente) y la competencia con otras bacterias, se instalan allí de manera permanente, crecen y se multiplican, constituyendo lo que se denomina la "microbiota normal". Aunque parte de ella se elimina, casi su totalidad es capaz de adherirse a receptores específicos de la mucosa intestinal, lo que favorece su permanencia y su mejor alimentación.

En el intestino grueso es donde la concentración de bacterias es mayor, del orden de 10^{11} y 10^{12} bacterias vivas por gramo de heces, lo que representa un tercio del peso en seco. Predominan las anaerobias estrictas de los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* y *Clostridium* junto con algunas anaerobias facultativas como las enterobacterias. *Bacillus fragilis*, aunque constituye menos del 1% de la flora total del colon, es el que se aísla en el 70% de las muestras clínicas de infecciones intraabdominales, debido a que se adapta mejor al medio donde se produce la alteración patológica y a su posesión de numerosos factores de patogenicidad: cápsulas, adhesinas, endotoxinas, proteasas, β -lactamasas, etc.

De forma tradicional y hasta hoy en día el estudio de la microbiota intestinal se aborda fundamentalmente a través del cultivo de los microorganismos y de su identificación mediante pruebas directas (la más habitual, el cultivo de la microbiota fecal en medios selectivos y diferenciales, y el análisis directo mediante recuento microscópico); e indirectas, que se basan en la estimación de la microbiota intestinal mediante el análisis y cuantificación de sus metabolitos o de ciertas actividades enzimáticas, como las glicosidasas o las reductasas. Pero estos métodos de estudio presentan el inconveniente de que muchas de estas actividades enzimáticas no son

específicas de un microorganismo o de un grupo bacteriano concreto, a lo cual hay que añadir la existencia de una gran plasticidad metabólica de estas especies.

Los inconvenientes que presentan estos métodos de estudio tradicionales han llevado al desarrollo de nuevas estrategias alternativas. La aplicación de técnicas de genética molecular ofrece un gran potencial de identificación, cuantificación y tipificación de los microorganismos del tracto gastrointestinal. Muchas estrategias se basan en las diferencias de secuencia en el gen que codifica el ARNr 16S, el cual, debido a su alternancia de regiones conservadas y variables, es especialmente útil para el estudio de la diversidad microbiana.

La microbiota del sistema gastrointestinal humano y su relación con la dieta, ha sido objeto de numerosos estudios de gran impacto científico durante la última década. Sin embargo, aunque las poblaciones microbianas del estómago y del intestino han sido caracterizadas con detalle, la microbiota de la bilis y de la vesícula biliar apenas ha sido estudiada hasta el momento, debido principalmente a las dificultades existentes para acceder al material biológico y a la falta de técnicas moleculares adecuadas. Además, las funciones de estos microorganismos autóctonos de la bilis y las características que les permiten colonizar y sobrevivir en dicho ambiente no han sido caracterizadas.

En la bilis se puede encontrar parte de la microbiota bucal, aunque en los casos de infección de la mucosa de la vesícula y vías biliares es frecuente aislar *Escherichia coli* y *Clostridium* como principales patógenos. En condiciones fisiológicas normales, las sales biliares actúan como detergentes biológicos que facilitan la solubilización de los compuestos lipofílicos en el intestino, favoreciendo así la digestión de grasas procedentes de la dieta. Sin embargo, se han descrito algunos trastornos biliares que dificultan ciertas funciones fisiológicas del organismo, siendo el más habitual la formación de cálculos biliares.

Los ácidos biliares son esteroides anfipáticos que son secretados en el duodeno como el componente mayoritario de la bilis, y su función es la emulsión de los componentes liposolubles de la dieta para facilitar su digestión y absorción. Otra función importante de estos ácidos biliares es su actividad antimicrobiana. Dadas sus propiedades anfipáticas, los ácidos biliares dañan las membranas de las células bacterianas interactuando con los fosfolípidos de membrana, lo que resulta en una

actividad bactericida. Dado que la secreción de bilis se incrementa cuando se comienza una dieta alta en grasas, se ha especulado que los ácidos biliares podrían ejercer una fuerte presión selectiva en la microbiota digestiva, especialmente cuando el hospedador se estuviera alimentando con una dieta alta en grasas.

La actividad antimicrobiana de la bilis fue descubierta en los primeros años del siglo pasado. Desde entonces, numerosos experimentos *in vitro* han demostrado la actividad bactericida de varios ácidos biliares. De hecho, durante muchos años se ha caracterizado tanto la resistencia como la sensibilidad a dichos ácidos de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias para facilitar la utilización de los probióticos en la industria láctea, ya que la bilis, dada su toxicidad, es considerada uno de los mayores retos que deben superar los probióticos para permanecer viables en el sistema digestivo humano.

Sin embargo, durante este periodo, los ácidos biliares han sido estudiados desde perspectivas químicas, médicas y farmacológicas, en detrimento a un punto de vista microbiológico. Hoy en día, relativamente pocos investigadores trabajan con ácidos biliares, especialmente en el campo de la microbiología.

Poco es sabido acerca de por qué una dieta alta en grasas altera la microbiota, en parte porque los investigadores han examinado un efecto "general" de la dieta más que un efecto "específico" de una dieta alta en contenido graso. Este tipo de dietas no solo difiere de una dieta estándar en el contenido graso, también en contenido en azúcar y otros parámetros. Se han formulado hipótesis acerca de que los ácidos biliares son la fuerza conductora en la modificación de la microbiota digestiva en una dieta alta en grasa, aunque esto no ha sido del todo demostrado.

El objetivo de este trabajo es recopilar información, datos y conclusiones en base a artículos ya publicados acerca de la influencia de distintos tipos de dieta sobre la composición de la microbiota digestiva y los ácidos biliares, para realizar un estudio acerca de cómo influye cada tipo de dieta sobre la composición química y biológica de la bilis.

Antecedentes bibliográficos

La idea de que la microbiota digestiva influye en la salud del hospedador se ha vuelto bastante popular, y se ha discutido si un desequilibrio en esta población bacteriana asociado a una dieta alta en grasas es un detonante para el desarrollo de enfermedades metabólicas como obesidad (Turnbaugh y col.; Hildebrandt y col.; Murphy y col.), diabetes (Cani y col.) e hipercolesterolemia (Martínez y col.) en modelos animales. En estudios realizados en humanos, se ha reportado una microbiota digestiva alterada en sujetos diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (Larsen y col.) y en pacientes con la enfermedad del intestino inflamatorio (Manichanh y col.; Frank y col.).

En la actualidad, se pone mucha énfasis en evaluar los cambios en la microbiota digestiva asociados con dietas altas en contenidos graso y/o enfermedades, y en clarificar cómo una microbiota tan modificada media el desarrollo de enfermedades metabólicas. Sin embargo, cuestiones de gran importancia sobre por qué y cómo estas dietas altas en grasas y/o estas enfermedades inducen cambios en la población bacteriana, permanecen sin resolver. Esto parece ser debido a una relativa falta de conocimiento sobre el efecto de los factores del hospedador en la formación de la microbiota digestiva *in vivo*.

En este contexto, Islam y col. han formulado una hipótesis acerca de si los ácidos biliares podrían ser buenos candidatos que aún no hayan sido bien caracterizados. Los ácidos biliares son esteroides que son sintetizados a partir del colesterol en el hígado y secretados en el duodeno como el componente principal de la bilis. Debido a sus propiedades anfipáticas, los ácidos biliares emulsionan lípidos, y de esta forma colaboran en la absorción de los nutrientes liposolubles. Una dieta alta en grasas incrementa la secreción de bilis para facilitar la digestión de lípidos (Reddy y col.). Durante el tránsito hacia el intestino grueso, los ácidos biliares son sometidos a modificaciones llevadas a cabo por algunos de los miembros de esta microbiota, dando lugar a los ácidos biliares secundarios (Ridlon y col.).

El ácido biliar secundario más abundante es el ácido deoxicólico (DCA), el cual proviene del ácido cólico (CA), el ácido biliar más abundante en la bilis humana. La conversión a ácidos biliares secundarios está mediada por una reacción de

deshidroxilación, catalizada por algunas especies de *Chlostridium*. Casi el 100% del CA es convertido a DCA en el intestino grueso.

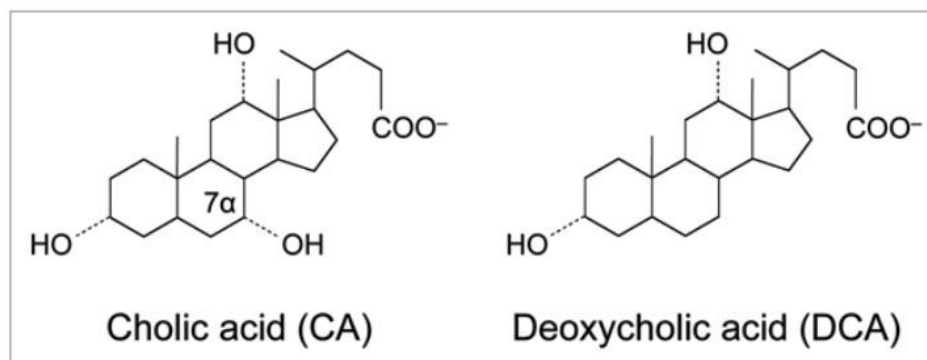


Fig. 1: Estructura del ácido cólico (CA) y el ácido deoxicólico (DCA), ácidos biliares representativos encontrados en el intestino humano.

Otro importante papel de los ácidos biliares es su actividad antimicrobiana (Kurdi y col.). En otros estudios realizados anteriormente, mediante experimentos *in vitro* utilizando bacterias del ácido láctico y bifidobacterias, que el primer mecanismo de acción antimicrobiana de los ácidos biliares es provocar daño a la membrana bacteriana. Concentraciones fisiológicas de CA y DCA en el intestino rompen la integridad de las membranas como resultado de su efecto detergente. Así, parece ser que los ácidos biliares ejercen una fuerte presión selectiva en la microbiota digestiva. De acuerdo a esto, solamente las poblaciones microbianas capaces de tolerar concentraciones fisiológicas de ácidos biliares pueden sobrevivir en el aparato digestivo. Esto se confirma especialmente al administrar una dieta alta en grasas, causando un incremento en el flujo de la bilis en el intestino. De acuerdo a ello, se ha demostrado recientemente en un modelo realizado con ratones que una dieta rica en grasas (también llamada "dieta occidental") cambia el balance de los dos filos más abundantes en la microbiota digestiva, en muchos casos incrementando los Firmicutes y disminuyendo los Bacteroidetes (Tumbaugh y col.; Hildebrandt y col.; Murphy y col.).

Por lo tanto, para examinar la posibilidad de que la población microbiana del aparato digestivo está controlada por los ácidos biliares *in vivo*, Islam y col. alimentaron a ratas con una dieta suplementada con CA y analizaron su microbiota cecal mediante secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S. Analizando la composición de los ácidos biliares fecales y los ácidos orgánicos cecales, así como algunas respuestas del

hospedador, los resultados revelaron importantes efectos del CA tanto en la microbiota como en su metabolismo. Estos cambios fueron similares a los observados en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Tumbaugh y col.; Hildebrandt y col.; Murphy y col.). Estos cambios proyectaron una luz sobre el hasta ese momento desconocido papel de los ácidos biliares en el control de la población microbiana del intestino, proveyendo además un nuevo punto de vista en el entendimiento de las enfermedades metabólicas y su fisiopatología en relación con la composición de la microbiota digestiva.

La microbiota constituye un órgano virtual que realiza numerosas funciones digestivas y metabólicas para el hospedador, las cuales incluyen una mejor recuperación calorífica a partir de los alimentos ingeridos, y la degradación de complejos polisacáridos de las plantas.

El hospedador mamífero puede ser considerado un "superorganismo", cuyo metabolismo total es la suma de su propio metabolismo y el metabolismo realizado por la comunidad microbiana con la que convive. La circulación enterohepática constituye un vehículo para este metabolismo, y los ácidos biliares, cuyo papel en el sistema global del mamífero es multifuncional, son una importante clase de metabolitos que someten a esta circulación enterohepática a un constante reciclaje y a la microbiota digestiva a una continua modificación.

Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado y a continuación se conjugan o bien con glicina o con taurina previamente a su secreción en la bilis y en el intestino delgado. En el intestino, los ácidos biliares restringen la proliferación bacteriana y sobrecrecimiento, mientras que las encimas bacterianas modifican los ácidos biliares primarios por medio de desconjugaciones, deshidrogenaciones, deshidroxilaciones y reacciones de sulfatación (Midtvedt y col.) para producir ácidos biliares secundarios, los cuales son reabsorbidos y retornan al hígado para ser sometidos a procesos adicionales.

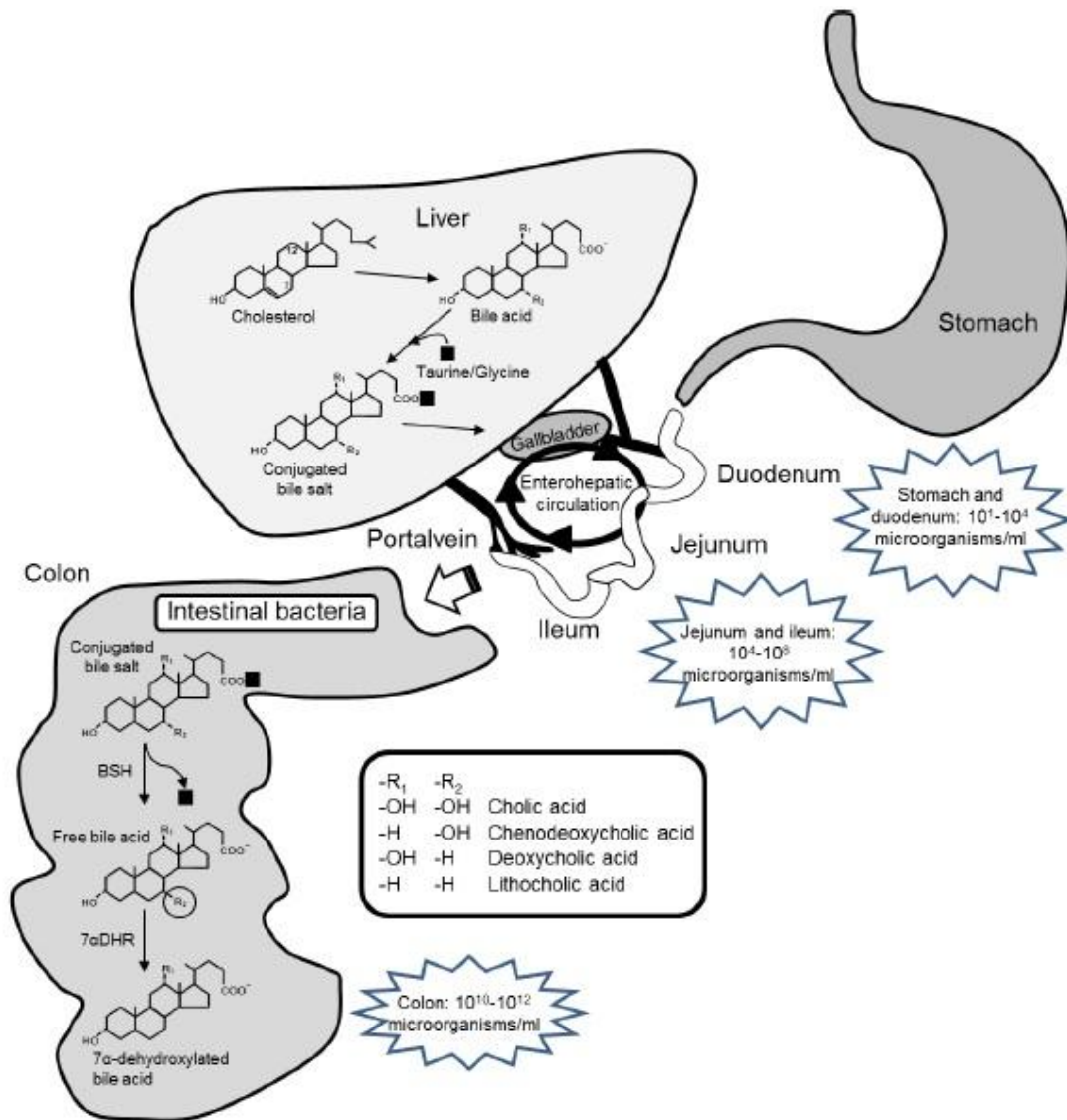


Fig 2: Densidad microbiana en diferentes partes del ecosistema gastrointestinal humano. Circulación enterohepática de las sales biliares y metabolismo de estas sales llevado a cabo por la microbiota intestinal.

Jonathan R. Swann y colaboradores han estudiado el impacto de la microbiota en los perfiles de ácidos biliares en diferentes tejidos (hígado, riñón y corazón) utilizando dos modelos de modulación de la microbiota digestiva. Concretamente, contrastaron un modelo de ratones libres de gérmenes frente al modelo con ratones convencionales para evaluar el efecto de la ausencia bacteriana a largo plazo en el perfil del ácido biliar, y, con posterioridad, analizaron el impacto de una perturbación microbiana más sutil adoptando un tercer modelo de ratones tratados con antibiótico (penicilina y estreptomycin).

A pesar de que los ácidos biliares conjugados dominaban el perfil hepático de los animales convencionales, los ácidos biliares no conjugados comprendían la mayor proporción en el riñón y el corazón. En contraste, en los animales libres de gérmenes, los ácidos biliares conjugados con taurina (especialmente el ácido taurocólico) dominaban los perfiles, apareciendo las especies no conjugadas y las conjugadas con glicina en una menor proporción.

Fueron registrados unos niveles mayores de taurina en los hígados libres de gérmenes en comparación a los convencionales. La diversidad de ácidos biliares era también menor en los animales libres de gérmenes, así como en los tratados con antibiótico, comparados con los animales convencionales.

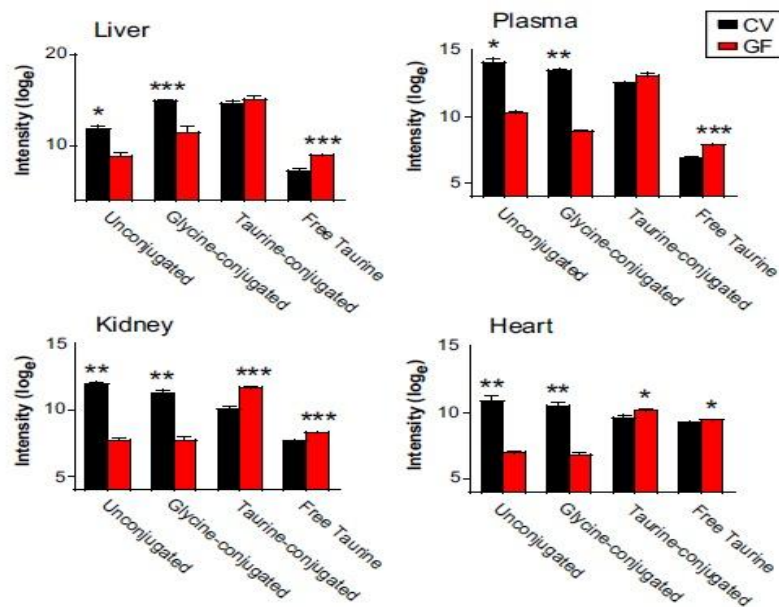


Fig 3: Las señales de los ácidos biliares basadas en su estado de conjugación son comparadas para los ratones libres de gérmenes (GF) y los convencionales (CV) en hígado, riñón, corazón y plasma.

Debido a que la secreción de bilis se incrementa en una dieta alta en grasas y que los ácidos biliares generalmente poseen una fuerte actividad antimicrobiana, se cree que estos ácidos podrían ser un factor determinante de la microbiota del tracto gastrointestinal en respuesta a una dieta con alto contenido graso, ya que los cambios en la microbiota cecal desencadenados por la administración de ácido cólico (el ácido biliar

más abundante en la bilis humana), son similares a aquellos observados en animales alimentados con dietas altas en grasas.

El tipo de dieta determina claramente la composición de la microbiota. Como ejemplo típico, las bifidobacterias asimilan directamente el prebiótico rafinosa como fuente de carbono, lo que permite su proliferación en el colon. Sin embargo, los ácidos orgánicos producidos en la fermentación de la rafinosa por estas bifidobacterias disminuyen el pH luminal, inhibiendo el crecimiento de numerosas poblaciones a la vez que alimentan a otros grupos de bacterias de esta comunidad. Por lo tanto, el proceso no es tan sencillo, incluso en el caso de los prebióticos. En términos de los factores derivados del hospedador en el intestino humano, distintos componentes digestivos, la inmunoglobulina A y la α -defensina* se han visto implicados en la composición de la microbiota. También el genotipo, el sexo y la edad han sido sugeridos como factores del hospedador. Sin embargo, la acción de cada uno de estos factores debe de estar completada con moléculas o condiciones ambientales directamente responsables de los cambios en la microbiota.

Poco es sabido acerca de por qué una dieta alta en grasas altera la microbiota, en parte porque los investigadores han examinado un efecto "general" de la dieta más que un efecto "específico" de una dieta alta en contenido graso. Este tipo de dietas no solo difiere de una dieta estándar en el contenido graso, también en contenido en azúcar y otros parámetros. Se han formulado hipótesis acerca de que los ácidos biliares son la fuerza conductora en la modificación de la microbiota digestiva en una dieta alta en grasa, aunque esto no ha sido del todo demostrado. Dado que la secreción de bilis se incrementa cuando se comienza una dieta alta en grasas (Reddy y col.), se ha especulado que los ácidos biliares podrían ejercer una fuerte presión selectiva en la microbiota digestiva, especialmente cuando el hospedador se estuviera alimentando con una dieta alta en grasas.

La actividad antimicrobiana de la bilis fue descubierta en los primeros años del siglo pasado. Desde entonces, numerosos experimentos *in vitro* han demostrado la actividad bactericida de varios ácidos biliares.* De hecho, durante muchos años se ha caracterizado tanto la resistencia como la sensibilidad a dichos ácidos de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias para facilitar la utilización de los probióticos en la

industria láctea,* ya que la bilis, dada su toxicidad, es considerada uno de los mayores retos que deben superar los probióticos para permanecer viables en el sistema digestivo humano.

Sin embargo, durante este periodo, los ácidos biliares han sido estudiados desde perspectivas químicas, médicas y farmacológicas, en detrimento a un punto de vista microbiológico. Hoy en día, relativamente pocos investigadores trabajan con ácidos biliares, especialmente en el campo de la microbiología. (Atsushi Yokota y col.).

Las investigaciones recientes sugieren que las dietas occidentales (altas en contenido graso) podrían estar contribuyendo al rápido incremento de la enfermedad del intestino irritable, y que las grasas animales saturadas ingeridas con este tipo de dieta pueden alterar la composición de la bilis y por lo tanto favorecer el crecimiento de microorganismos pro-inflamatorios en el intestino.

Dekvota y colaboradores* han presentado un estudio pionero que demuestra que la grasa de la dieta puede alterar la microbiota del tubo digestivo de ratones indirectamente, modificando el pool de ácidos biliares que segregan estos animales. Los autores además proporcionan un mecanismo plausible mediante el cual las dietas ricas en ciertas grasas saturadas podrían contribuir a la enfermedad del intestino irritable.

Dekvota y colaboradores comenzaron a explorar si era posible, y si lo era, cómo, si las grasas saturadas derivadas de animales que abundan en las dietas occidentales podrían afectar a la microbiota digestiva de los ratones. Testaron tres dietas distintas altas en grasas, dos de las cuales contenían grasas saturadas provenientes de la leche y de la manteca de cerdo respectivamente, y la tercera estaba basada en el aceite de cártamo (una grasa poliinsaturada). Los investigadores entonces analizaron la diversidad de bacterias en el aparato digestivo del ratón secuenciando el gen microbiano que codifica el rRNA 16S.

La dieta rica en grasas procedentes de la leche promovía un incremento en la abundancia del microorganismo conocido como *Bilophila wadsworthia* y, aunque con un menor número, otros como *Lactobacillus murinus* y especies de *Alistipes*. Cabe destacar que *B. wadsworthia* se encuentra en pequeñas cantidades en los aparatos

digestivos de personas saludables, pero es frecuentemente detectada en muestras clínicas de pacientes con apendicitis y otras infecciones*. Aunque el consumo de la dieta rica en grasas procedentes de la leche no afectó a la salud de los ratones de tipo salvaje, sí que incrementó la aparición y la incidencia de colitis en ratones genéticamente susceptibles que carecían de interleukina-10, una molécula que interviene en la señalización en procesos antiinflamatorios.

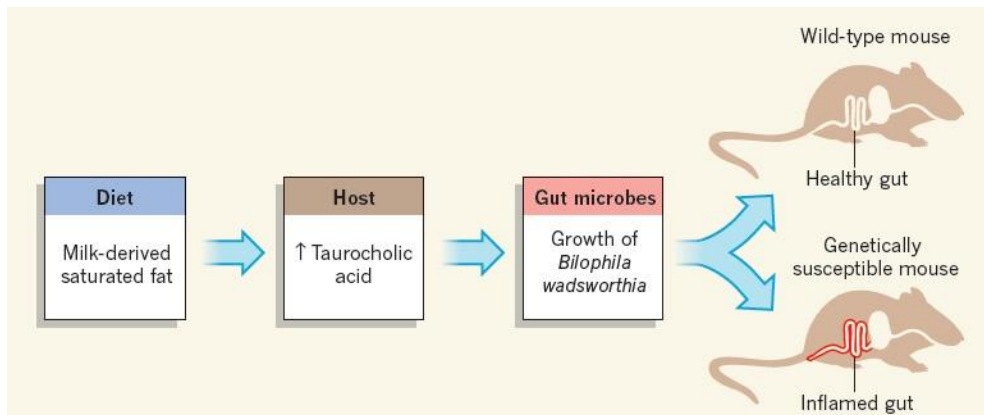


Fig 4: Dekvota y colaboradores informan de que, en ratones, una dieta rica en grasas saturadas derivadas de la leche conllevó a un incremento en la producción de ácido taurocólico (sustancia que colabora en la digestión de las grasas) que, como consecuencia, estimuló el crecimiento de ciertos microorganismos. En ratones genéticamente susceptibles, una de estas especies (*B. wadsworthia*) desencadenó inflamación intestinal y colitis.

¿Por qué la grasa procedente de la leche estimuló el crecimiento de *B. wadsworthia*? Este microorganismo prospera en presencia de ácido taurocólico (una combinación de ácido biliar y taurina, molécula que contiene azufre)*, y se cree que el ácido taurocólico es producido más fácilmente durante la ingestión de grasas procedentes de la leche*. De hecho, los investigadores han confirmado que el consumo de materia grasa procedente de la leche conllevaba a un incremento en la concentración de ácido tauricólico en la bilis de los ratones deficientes en interleukina-10, y que esta bilis promovía el crecimiento de *B. wadsworthia in vitro*. Además, la adición de ácido taurocólico a dietas bajas en grasas estimulaba la colonización de este microorganismo en los ratones carentes de interleukina-10.(Dekvota y col.).

La literatura en la actualidad provee de nuevas pruebas de que la disbiosis de la microbiota digestiva (cambios en la composición y/o la actividad de las bacterias del sistema digestivo, a nivel de filo, género o especie) afecta al metabolismo del hospedador así como al almacenamiento de energía (Cani y col.). Se han propuesto numerosos mecanismos que podrían relacionar eventos ocurridos en el colon con la regulación del metabolismo energético, como por ejemplo el aprovechamiento de energía de la dieta, la síntesis de péptidos digestivos implicados en la homeostasis, y la regulación del almacenamiento de lípidos (Cani y col.).

Previamente se ha reportado que la alimentación alta en grasas estaba asociada con modificaciones en la microbiota del aparato digestivo en ratones, lo cual conduce entre otras cosas a un descenso en los contajes de bifidobacterias (Cani y col.). Un diferente estudio demostró que la obesidad debida a la dieta estaba relacionada con cambios producidos en la ecología microbiana del aparato digestivo, dando lugar a un incremento en la capacidad de la microbiota del tramo digestivo distal para promover la adiposidad en el hospedador (Turnbaugh y col.).

Además, estudios recientes (Audrey y col.) ha demostrado que los fructanos obtenidos de la inulina (un carbohidrato no digerible que selectivamente incrementa el número de bifidobacterias en el colon, por lo cual puede ser considerado un prebiótico) presente en la raíz de achicoria, podría ser un nutriente prometedor para el control de las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad, incluyendo esteatosis (acumulación anormal de la grasa) y dislipidemia (alteración en el metabolismo de los lípidos) (Cani y col.; Delzenne y col.). De hecho, los resultados de Audrey y col. demuestran que el incremento selectivo de bifidobacterias en la microbiota digestiva a partir de suplementación con fructanos mejora la diabetes provocada por un alto consumo de grasas en ratones.

Los fructanos son además capaces de mejorar el funcionamiento de la barrera digestiva durante la obesidad y la diabetes a través de un mecanismo que incluye al glucagón GLP-2, péptido derivado del proglucagón (Cani y col.).

El conjunto de todos estos datos sugiere que los carbohidratos no digeribles, cuando son selectivamente fermentados por los microorganismos digestivos, ejercen un efecto beneficioso en la obesidad y en los problemas metabólicos asociados a la misma.

Los fructanos del tipo de la inulina son típicamente estudiados ya que se trata de los primeros compuestos que encajaban con el concepto de "prebiótico", definido como la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de uno o de un número limitado de géneros o especies de microorganismos en la microbiota que confieren beneficios para la salud del hospedador (Roberfroid y col.).

Otros carbohidratos no digeribles, los cuales son gradualmente fermentados a través del colon y que pueden ser aplicados a diferentes matrices alimentarias, podrían constituir sustratos alternativos válidos para evaluar sus efectos en la salud relacionados con la influencia que ejerzan sobre la composición de la microbiota.

Los arabinoxilanos (AX) son los carbohidratos no digeribles más importantes presentes en el trigo, representan el 50% de las fibras dietéticas y están mayoritariamente presentes en el salvado y la aleurona (Neyrinck y col.). Los AX son degradados selectivamente en el colon por bacterias intestinales que poseen enzimas degradadoras de AX como xilanasas y arabinofuranosidasas, y representan un nuevo tipo de potenciales prebióticos (Hughes y col.). Dado que se presentan en distintas formas, abarcando desde fibras solubles e insolubles hasta fracciones de cadena corta de alto peso molecular modificadas enzimáticamente, los efectos fisiológicos de los AX aún son bastante desconocidos. Sin embargo, algunos estudios indican que se comportan como fibras fermentables en el colon, con diferentes perfiles de fermentación dependiendo de las propiedades fisico-químicas y el grado de polimerización, y que además tienen un impacto potencial en el metabolismo de los lípidos y la glucosa (López y col.; Lu y col.).

Existen bastantes estudios cuyo objetivo es investigar y realizar un análisis más profundo de las consecuencias que conlleva el consumo de los denominados prebióticos en las comunidades microbianas del aparato digestivo y en sus parámetros biológicos. Persiguiendo este objetivo, Amandine Everard y col. sometieron tanto a ratones genéticamente obesos (*ob/ob*), como a ratones enfermos de obesidad provocada por la dieta y ratones diabéticos tanto con una dieta enriquecida con prebióticos como con una dieta control.

Anteriormente se ha demostrado que los prebióticos mejoran la función de la barrera digestiva y alivian la inflamación y la resistencia a la insulina asociada con la

obesidad incrementando la excreción de hormonas como los péptidos GLP-1 y GLP-2. Aunque los efectos beneficiosos de los prebióticos han sido relacionados con un efecto concomitante en bifidobacterias, no se ha establecido ninguna relación causal clara entre esta familia y sus efectos metabólicos beneficiosos. Así, para obtener un análisis más determinista de la microbiota digestiva, Everard y col. combinaron múltiples métodos moleculares, incluyendo PCR cuantitativa, pirosecuenciación y microarrays filogenéticos del rRNA 16S, para generar perfiles más exhaustivos de las comunidades microbianas de ratones obesos con o sin la presencia de prebióticos en su dieta.

Por otra parte, para determinar si otra fibra no fermentable, la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), podría alterar la microbiota intestinal, y si dichos cambios se correlacionarían con mejoras metabólicas, ratones C57B/L6, que es la cepa endogámica de ratón de laboratorio más ampliamente utilizada para ser manipulada genéticamente en el estudio de las enfermedades humanas, primeramente fueron normalizados en una dieta alta en grasas, y posteriormente o bien mantenidos en este tipo de dieta (control), o cambiados al mismo tipo de dieta pero con un suplemento de un 10% de HPMC, o bien a una dieta baja en grasas.

Comparados con el grupo control, tanto el grupo que realizaba la dieta baja en grasas como el correspondiente a la dieta alta en grasas con el suplemento de HPMC redujeron su ganancia de peso, su colesterol en el plasma y sus triglicéridos en el hígado, y, como revelaron los resultados obtenidos por 454-pirosecuenciación del gen que codifica el rRNA 16S, se produjo un decrecimiento en la diversidad de su microbiota. Ambos grupos, tanto el que realizó la dieta baja en contenido graso como al que se le sometió a la dieta alta en grasas con el suplemento de HPMC, vieron incrementado su número de *Erysipelotrichaceae* intestinales, y decrecida su cantidad de *Lachnospiraceae*, en tanto que solamente los sometidos al complemento de HPMC incrementaron el número de *Peptostreptococcaceae*, y vieron disminuida su cantidad de *Ruminococcaceae*.

Microorganismos específicos fueron directamente asociados con un cambio en el peso y los parámetros metabólicos en los ratones complementados con HPMC y los ratones sometidos a la dieta con contenido elevado en materia grasa, pero no en los ratones sometidos a la dieta baja en grasas, lo cual indica que la microbiota intestinal

podría jugar diferentes papeles durante las dos modulaciones dietéticas. Este trabajo indica que HPMC es una fibra prebiótica en potencia que influye en la microbiota del intestino y mejora el metabolismo del hospedador. (*Laura M. Cox y col.*).

La secreción biliar de lípidos (ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol) es clave para la homeostasis del colesterol y la absorción de la grasa proveniente de la dieta en el intestino delgado. Bajo condiciones fisiológicas, los ácidos biliares regulan la secreción de fosfolípidos y colesterol en la bilis. El hecho de que los ácidos biliares sean hidrofóbicos es uno de los numerosos factores que parece ser un determinante importante para la tasa de secreción de lípidos biliares (*Vlahcevic y col.*).

El conjunto de fosfolípidos biliares está constituido en un 90% por fosfatidilcolina, lo cual sugiere la existencia de un sub-pool hepático específico de fosfatidilcolina destinado a la secreción de bilis (*Yousef y col.*; *Gregory y col.*). Este pool de fosfatidilcolina en las membranas microsomas parece que se establece para la secreción de bilis y es modulado por el flujo de ácidos biliares en el hígado (*Lowe y col.*; *Coleman y col.*). Estudios recientes han demostrado que en ratas, la fosfatidilcolina biliar podría derivar no solamente de un pool microsomal hepático preformado, sino que también de una fuente extrahepática, las lipoproteínas circulantes, mayoritariamente lipoproteínas de alta densidad (HDL) (*Kawamoto y col.*; *Portal y col.*). La fosfatidilcolina de nueva síntesis solo constituye un pequeño porcentaje de la fosfatidilcolina biliar total.

Ha sido probado que alimentar a ratas con lecitina de soja pura o semi-purificada provoca una disminución del colesterol en plasma por un mecanismo relacionado con un aumento de la secreción de lípidos biliares y de la formación de bilis (*Rioux y col.*; *Polichetti y col.*). Recientemente, *LeBlanc y col.* han demostrado que este incremento de lípidos en la bilis se deriva de pools microsomas hepáticos y de la fosfatidilcolina y el colesterol contenidos en las HDL, proporcionando un mayor apoyo al importante papel de las HDL en la modulación de la salida de lípidos en la bilis.

Una dieta enriquecida en lecitina de soja puede también prevenir la colestasis intrahepática (obstrucción del flujo de la bilis en el hígado) inducida por la infusión de

ácido cólico (Rioux y col.). Cuando los ácidos biliares son introducidos por vía intravenosa en ratas en cantidades crecientes, se alcanza una capacidad de transporte hepática máxima (BASRm, del inglés "bile acid secretory rate maximum"), a continuación de la cual la formación de bilis y la salida de lípidos están claramente desacompañadas (colestasis).

Estudios previos indican que la lecitina obtenida a través de la dieta podría ejercer su efecto beneficioso expandiendo el pool de fosfatidilcolina hepático destinado a la bilis (Yousef y col.; Barnwell y col.).

La lecitina obtenida a través de la dieta se metaboliza hacia lisolecitina, ácidos grasos y colina, lo cual conlleva a plantearse la contribución de la colina a ese aumento de la salida de lípidos biliares y la formación de bilis inducida por la lecitina. Los datos demuestran que el 60-85% de la fosfatidilcolina en el hígado es sintetizada vía citidin difosfato colina (CDP colina), procediendo el resto de la metilación de la fosfatidiletanolamina (Canty y col.).

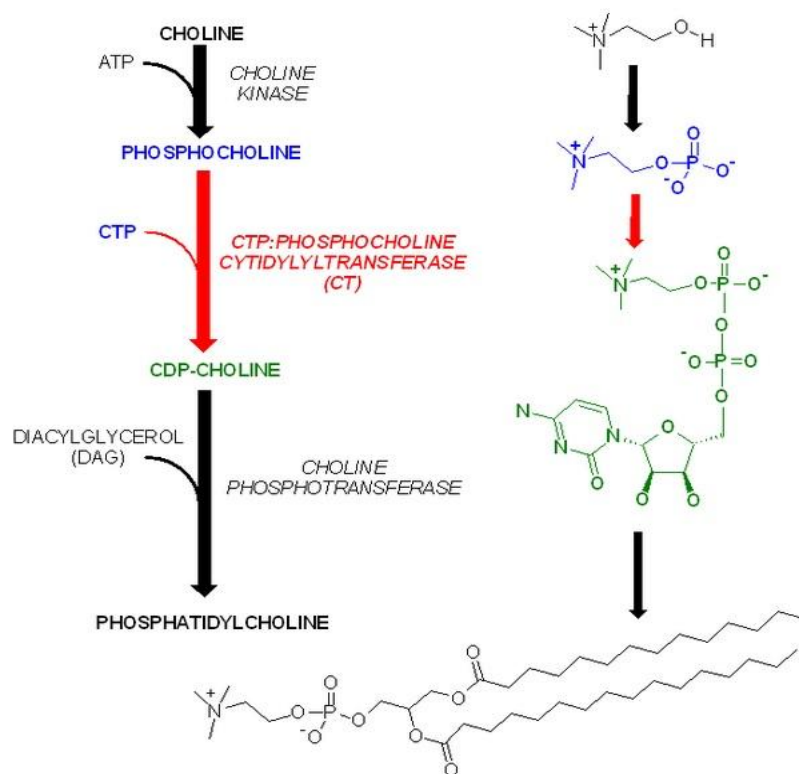


Fig 5: La formación del 60-85% de la fosfatidilcolina en el hígado se lleva a cabo mediante la ruta de la CDP-colina.

LeBlanc y col. examinaron el papel de la colina ingerida en la dieta en los efectos beneficiosos de la lecitina para la formación de la bilis. Para ello compararon los efectos de dos dietas enriquecidas en lecitina y libres de colina aplicadas en ratas bajo condiciones basales y con colestasis inducida.

Es cada vez más creciente la preocupación que existe en cuanto a los recientes cambios que se han producido en el estilo de vida, más notablemente el incremento de las dietas occidentales altas en grasas y en azúcar, las cuales alteran la composición genética y la actividad metabólica de nuestra microbiota residente. Estos cambios inducidos por la dieta en las comunidades microbianas asociadas al aparato digestivo humano son ahora sospechosos de contribuir al crecimiento que se está produciendo del número de enfermedades crónicas en los países desarrollados, incluyendo la obesidad y la enfermedad inflamatoria del intestino. Sin embargo, aún no está clara la rapidez y reproducibilidad con que las bacterias digestivas responden a los cambios en la dieta.

Los humanos coexistimos con nuestra microbiota actuando como mutualistas, pero esta relación en ocasiones se transforma en patológica, como en la obesidad, la diabetes, la aterosclerosis, y enfermedades inflamatorias del intestino (Hooper y col.; Emminger y col.). Diferentes factores, incluyendo edad, genética y dieta podrían influir en la composición de la microbiota. De todos ellos, la dieta es la más fácil de modificar y se presenta como la ruta más simple para realizar una intervención terapéutica.

Recientemente, un análisis de las comunidades que forman la microbiota digestiva propuso la predominancia de tres variantes o enterotipos, denominados *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*, respectivamente (Arumugam y col.). La base para esta clasificación permanece desconocida, pero parece ser independiente de la nacionalidad, el sexo, la edad o el índice de masa corporal.

Wu y col. han investigado la asociación de las variables dietéticas con la microbiota digestiva, para lo cual primeramente realizaron un análisis cruzado de 98 voluntarios saludables, en el cual recolectaron información acerca de la dieta de cada uno de ellos utilizando dos tipos de cuestionarios: uno que recopilaba a dieta llevada a cabo recientemente, y otro para la dieta realizada de forma habitual y a largo plazo.

Por otro lado, Wu y col. retuvieron a 10 individuos diferentes en un entorno hospitalario para realizar un estudio con una dieta controlada, con el objetivo de comparar una dieta alta en grasas y baja en fibra con una dieta alta en fibra y baja en grasas. Se recolectaron muestras de heces (Wu y col.) y se analizaron muestras de DNA por pirosecuenciación. Además se recolectaron biopsias rectales los días 1 y 10.

Se extrajeron datos de nutrientes específicos asociados con la variación de la microbiota en los 98 individuos del análisis cruzado, junto con datos de factores demográficos. Para cada uno de dichos nutrientes, se utilizaron coeficientes de correlación de Spearman (medida de la asociación o independencia entre dos variables aleatorias continuas) para identificar el género bacteriano asociado.

Los nutrientes provenientes de la grasa en contra de los productos vegetales con fibra, mostraban asociaciones inversas con los taxones microbianos. Este tipo de asociaciones también fueron halladas entre aminoácidos y proteínas contra carbohidratos. Los filos correlacionados positivamente con la grasa pero negativamente con la fibra eran predominantemente Bacteroidetes y Actinobacteria, mientras que los filos Firmicutes y Proteobacteria presentaban la asociación inversa.

Los resultados de Wu y col. fueron obtenidos a largo plazo. Lawrence y col. realizaron un experimento con individuos para comprobar si las intervenciones dietéticas en humanos podían alterar las comunidades microbianas de una manera rápida y específica. Para diseñar este estudio, prepararon dos tipos de dieta que variaban de acuerdo a la fuente primaria de alimento: una dieta "basada en plantas", rica en cereales, legumbres, frutas y verduras; y una dieta "basada en animales", compuesta por carnes, huevos y quesos. Se optó por estas fuentes para abarcar toda la diversidad de los regímenes modernos. Cada dieta se consumió durante 5 días consecutivos por voluntarios de ambos sexos. Estos voluntarios fueron observados durante cuatro días antes de cada tipo de dieta para evaluar los hábitos normales de alimentación (periodo basal), y durante seis días después de cada tipo de dieta para valorar la recuperación microbiana (periodo de lavado).

La capacidad para explorar la composición de la microbiota fue notablemente mejorada gracias al desarrollo de la metagenómica (Riesenfeld y col.; National Research Council) que ya ha permitido la producción del primer catálogo de microbiota

digestiva humana (Qin y col.) y estratificar individuos teniendo en cuenta su perfil genómico digestivo en diferentes enterotipos (Arumugam y col.).

Para investigar las relaciones temporales entre la toma de alimentos, la microbiota digestiva y los fenotipos metabólicos e inflamatorios, Aureliè Cotillard y col. sometieron a 49 individuos obesos o con sobrepeso a una dieta de energía limitada y con alto contenido en proteínas durante seis semanas, seguida de otras seis semanas de dieta de mantenimiento. Las características bioclínicas así como las propiedades cualitativas y cuantitativas detalladas acerca de estas tomas de alimentos fueron obtenidas en el periodo basal, a las seis semanas y a las doce semanas. La reducción de un 35% en la cantidad de energía ingerida en las primeras seis semanas se asoció a una reducción en la cantidad de grasa corporal y en el diámetro de los adipocitos, así como mejoras en la sensibilidad a la insulina en los marcadores del metabolismo y la inflamación.

Estos investigadores han reportado que los individuos que tenían una menor riqueza genética presentaban un metabolismo más lento e inflamaciones leves. También han demostrado que la intervención dietética mejora esta baja riqueza genética, pero parece ser menos eficiente para las variables inflamatorias en este tipo de individuos. Sin embargo, estos individuos con poca riqueza genética podrían ser mejores candidatos para una intervención de este tipo ya que en ellos sería más eficaz.

Consideraciones teóricas

ARNr 16S.

Los ácidos nucleicos, macromoléculas comunes de todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas.

Esta idea se ha venido utilizando durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: *Eubacteria* y *Archaeobacteria*. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana.

Los ARNr 16S pueden caracterizarse en términos de secuencia parcial, mediante el método de catalogación de oligonucleótidos, utilizado en los estudios pioneros de Woese. Siguiendo esta técnica, el ARNr 16S marcado *in vivo*, y purificado, se trata con la enzima ribonucleasa T1. Los fragmentos generados se separan, determinándose posteriormente la secuencia de todos aquellos que incluyan al menos seis nucleótidos. A continuación, las secuencias de la colección de fragmentos correspondientes a diferentes bacterias se alinean y comparan utilizando programas informáticos, para calcular finalmente los coeficientes de asociación.

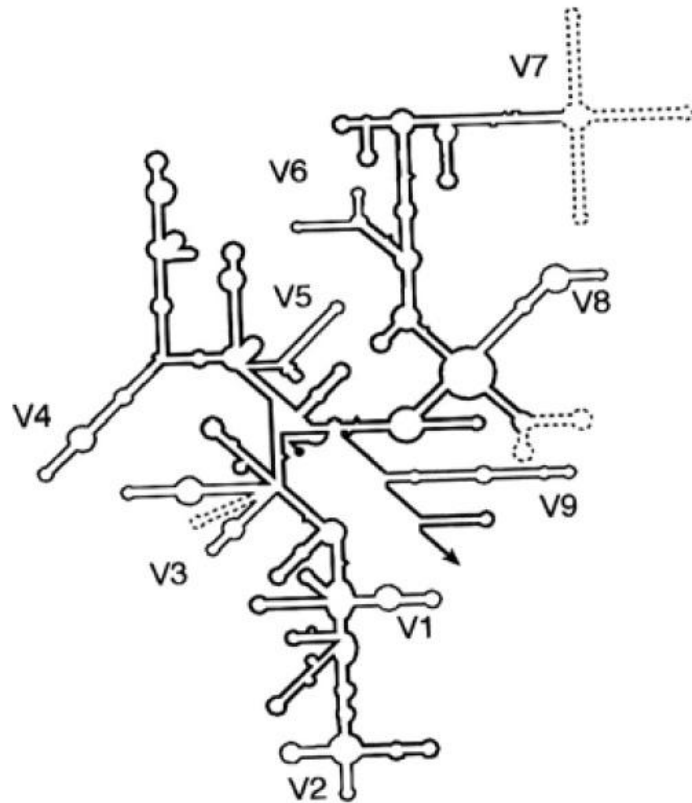


Fig 6: Estructura del ARNr 16S en la que se señalan las regiones variables más importantes.

PCR Cuantitativa.

La PCR cuantitativa es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de DNA. Para ello emplea un molde de DNA, al menos un par de primers específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una DNA-polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le añade una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición se realiza a continuación de cada ciclo de amplificación y debido a ello este método también es denominado PCR en tiempo real.

Secuenciación.

La secuenciación es una tecnología de determinación de la secuencia de un DNA a gran escala, aplicable a genomas completos, mediante luminiscencia.

La muestra biológica se carga en una placa de fibra óptica, que permite transmitir la luz producida por quimioluminiscencia durante la reacción de secuenciación hasta una cámara de captación de imágenes, la cual posee multitud de pocillos.

El fundamento de la secuenciación se basa en controlar el flujo secuencial y cíclico de nucleótidos sobre la placa en combinación con un sistema de detección bioluminiscente que permite convertir los productos generados durante la incorporación de nucleótidos (pirofosfato) en luz (por medio de la luciferasa) que es detectable por el dispositivo CCD.

Procedimiento:

- Mediante una emulsión se generan microrreactores (microesferas); se intenta que en cada microesfera haya un único fragmento de ADN.

- En cada microrreactor se encuentran los elementos necesarios para la reacción de PCR: iniciadores, dNTPs, polimerasa, cuentas de secuenciación y, habitualmente, un único fragmento de ADN molde.

- Mediante la amplificación por PCR, se generan numerosas copias del mismo fragmento de ADN original.

- Después se liberan las microesferas de la emulsión y se colocan en placas donde se procede con la secuenciación en paralelo. Para realizar la secuenciación se vierte la emulsión sobre una fase sólida con celdillas. Tras añadir las microesferas se incorporan esferas que inmovilizan a estas y se realiza una pirosecuenciación en cada celdilla. La secuenciación se lleva a cabo en paralelo, añadiendo uno de los cuatro nucleótidos y observando qué celdilla se ilumina. A continuación se lava y se añade el siguiente nucleótido, y se repite el mismo proceso hasta completar la secuencia.

Resultados de modelos teóricos

Los ácidos biliares son un factor presente en el hospedador que regula la microbiota digestiva.

Islam y col., para averiguar si realmente los ácidos biliares constituyen un factor del hospedador que regula la composición de la microbiota cecal, dividieron las ratas en tres grupos. Cada grupo fue alimentado por un tipo de dieta durante diez días: una dieta control (grupo control), una dieta suplementada con una dosis baja de ácido cólico (CA) y otra dieta cuyo suplemento de CA era de una dosis más alta. Durante el periodo de estudio, todos los animales se encontraban sanos y no había ninguna diferencia significativa en la ingesta de alimentos, el peso final o la ganancia de peso, entre los grupos.

En el grupo suplementado con dosis alta de ácido cólico se produjo una reducción significativa del peso del tejido adiposo del epidídimo, y en ambos grupos suplementados con CA se observó un menor nivel de adiponectina sérica. Además, las observaciones histológicas indicaron que aparentemente no existía inflamación en las mucosas cecal y del colon.

El perfil de ácidos biliares en el intestino está determinado por la combinación de su biosíntesis y su modificación en el hígado, y su bioconversión por las bacterias intestinales. En los roedores, este perfil está dominado por ácidos muricólicos, y el resto de componentes son en general similares a aquellos encontrados en humanos.

El incremento del flujo de ácidos biliares en ambas dietas suplementadas con CA, aumentó radicalmente las concentraciones del bactericida ácido deoxicólico (DCA) y del CA administrado, mientras que la biosíntesis y el metabolismo de los ácidos muricólicos no se vio aparentemente afectada. Esto indica de forma clara que el CA de la dieta es mayoritariamente transformado en DCA por una deshidroxilación bacteriana en el ciego de las ratas (Ridlon y col.). Un efecto similar ocurre en el colon humano (Ridlon y col.). Además, el ácido 7-oxo-deoxicólico (otro metabolito formado a partir del CA) aumentó en gran cantidad en el grupo suplementado con una dosis alta de CA. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de este metabolito es bastante más baja que la del DCA (2011).

La concentración total de ácidos biliares para los grupos suplementados con dosis baja de CA y con dosis alta se incrementó 6 y 20 veces respectivamente, comparadas con el grupo control. La concentración de DCA en el grupo al que se le administró la dosis alta resultó ser muchísimo más elevada que el rango fisiológico en el colon humano. Es importante subrayar que la concentración cecal estimada de DCA en los grupos suplementados es lo suficientemente alta como para inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias intestinales típicas, lo cual sugiere que los niveles de DCA en estos grupos ejerce un gran estrés ambiental en la microbiota cecal.

Se esperaba que este estrés provocado por los ácidos biliares afectase al metabolismo fermentativo de la microbiota digestiva. Como se muestra en la figura, las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC, como acetato, propionato y butirato), decrecieron cuando la concentración de CA en la dieta creció. La disminución fue significativa en el grupo que recibió la dosis alta, en el cual la concentración total de AGCC descendió aproximadamente un 57%, en comparación con el grupo control. Dentro de los AGCC, el acetato y el butirato mostraron unas reducciones más marcadas. En respuesta a estos cambios, el pH cecal se incrementó significativamente en el grupo al que se le administró la dosis alta de CA.

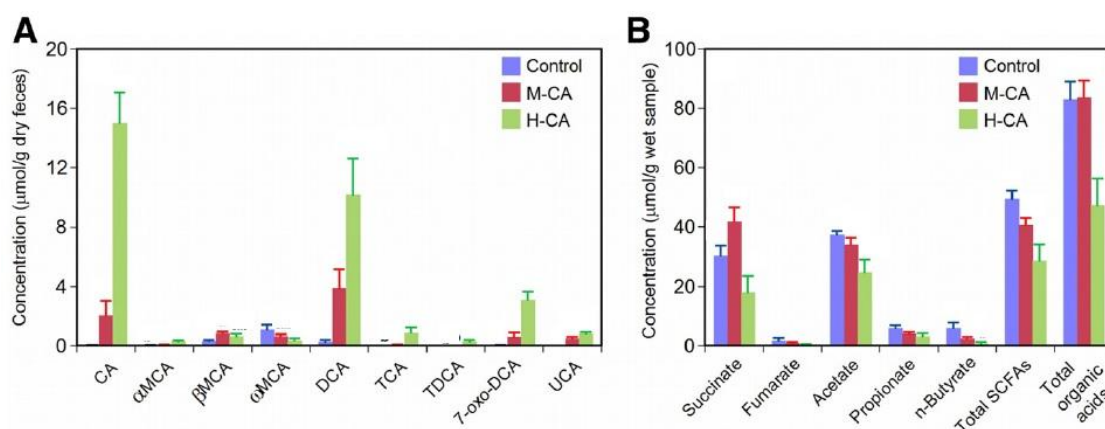


Fig 7: Efecto de la administración de CA en la composición de los ácidos biliares (A) y de los ácidos orgánicos (B) en ratas de los tres grupos diferentes (M-CA: grupo de dosis baja; H-CA: grupo de dosis alta).

En cuanto a las comunidades microbianas, el grupo control mostraba una variedad de morfologías desde cocos hasta bacilos largos, mientras que los animales suplementados con CA revelaban mucha menos variedad y cantidad, además de mostrar

en su mayoría cocos y bacilos cortos. Esta disminución en la cantidad probablemente fuese debida a la actividad antimicrobiana del DCA. En el grupo al que se administraron altas dosis de ácido cólico, se produjo una reducción importante del total de bacterias, hasta del 51% comparada con el grupo control. Estos resultados sugieren que ambas poblaciones bacterianas, tanto la del grupo que ingirió dosis bajas de CA como la del que tomó dosis altas, estaban alteradas.

La secuenciación de las librerías de genes del rRNA 16S demuestran que la población bacteriana del ciego del grupo control estaba dominada por Firmicutes y Bacteroidetes, junto con poblaciones minoritarias de Proteobacteria y Actinobacteria. Esta distribución es similar a la hallada previamente en humanos (Eckburg y col.) y ratones (Ley y col.). Por el contrario, en los grupos alimentados con un suplemento de CA, se produjo una extensión significativa de los Firmicutes hasta el 95% aproximadamente del total, a expensas de Bacteroidetes y Actinobacteria.

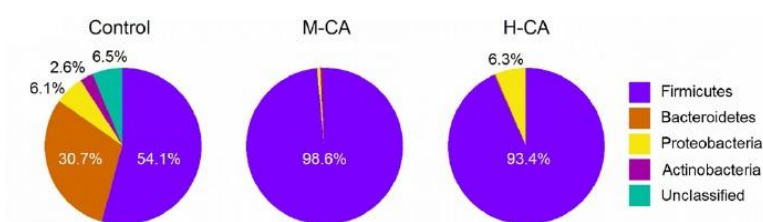


Fig 8: composición de la microbiota cecal (filos) de las ratas de los tres grupos según reveló la secuenciación de los genes del rRNA 16S.

En general, los resultados obtenidos mediante la técnica de FISH coinciden con los obtenidos mediante la técnica de secuenciación del rRNA 16S, así, Islam y col. concluyen que el ácido cólico en la dieta incrementa la abundancia relativa de Firmicutes y disminuye la de Bacteroidetes en la microbiota cecal de las ratas.

Estos resultados demuestran el hasta ese momento inexplorado papel de los ácidos biliares como un factor del hospedador que controla la microbiota digestiva *in vivo*.

En el intestino, donde densas poblaciones de bacterias compiten por una fuente de energía limitada, una pequeña diferencia en la sensibilidad al ácido deoxicólico podría conllevar a un drástico desequilibrio en el equilibrio establecido previamente,

como se demostró en la modificación observada en el ratio de Firmicutes / Bacteroidetes. *Bacteroides* es el género más abundante y variable entre los individuos (Arumugam y col.; Tap y col.), probablemente porque es más susceptible que *Clostridia* a las fluctuaciones en la concentración de DCA en el intestino.

En general, esta modificación de la población microbiana producida como consecuencia de la administración de ácido cólico es similar a las alteraciones observadas en la microbiota de los animales alimentados con un alto contenido en grasas: un incremento en el ratio Firmicutes / Bacteroidetes, y una reducción de la diversidad de la población (Tabla 1).

Animal experimental	Dieta	Incremento F/B	Disminución de diversidad	Incremento en la abundancia relativa de	Referencia
Rata	Suplemento de CA	Sí	Sí	Clase <i>Clostridia</i> y <i>Erysipelotrichi</i>	Yokota y col.
Ratón	Alta en grasa	Sí	Sí	Clase <i>Mollecutes</i>	Turnbaugh y col.
Ratón	Alta en grasa	Sí	Sin descripción	Clase <i>Clostridia</i>	Hildebrandt y col.
Ratón Humanizado	Alta en grasa	Sí	Sin descripción	Clase <i>Erysipelotrichi</i>	Turnbaugh y col.
Hamster	Alta en grasa	Sin cambios (originalmente alto F/B)	Sí	Clase <i>Erysipelotrichi</i> (género <i>Allobaculum</i>)	Martínez y col.

Tabla 1: Alteraciones de la microbiota provocadas por la administración de una dieta suplementada con ácido cólico o una dieta alta en grasa.

En ratones *ob/ob*, incluso la administración de una dieta estándar incrementaba el ratio de Firmicutes / Bacteroides (Turnbaugh y col.), probablemente porque estos ratones tienen una mutación en el gen de la leptina y comen más que los ratones normales, lo que resulta en la ingestión de más grasa en su dieta.

En estudios realizados con humanos, el ratio entre Firmicutes /Bacteroidetes no cambió durante la intervención con una dieta en la que se restringían los carbohidratos (Duncan y col.), posiblemente porque los carbohidratos no afectan a la excreción de bilis. La administración de una dieta en la que se restringían las grasas y baja en calorías durante un año a individuos obesos resultó en una disminución de este ratio (Ley y col.), lo que sugiere que la disminución de la excreción de bilis revertía este ratio a un rango normal.

Swann y col., en su estudio de la modulación del metabolismo de los ácidos biliares en diferentes tejidos del hospedador, han perfilado un panel de ácidos biliares en el hígado, el riñón, el corazón y el plasma de ratas y encontrado perfiles característicos

específicos de cada uno de estos tejidos. Con ello, proponen que el panel de ácidos biliares medido en el corazón podría servir como función reguladora y de señalización en este tejido, ya que tanto transportadores como receptores específicos de los ácidos biliares se expresan en dicho tejido.

La ausencia de vida bacteriana en el tracto digestivo a largo plazo tuvo un profundo efecto en los perfiles de ácidos biliares en el hígado, el riñón y el corazón, modificando el balance hacia casi exclusivamente especies conjugadas con taurina.

La perturbación a corto plazo en la microbiota digestiva llevada a cabo por tratamiento con antibióticos modulaba los perfiles de una manera similar, pero el efecto era menos pronunciado.

Estos resultados sugieren que los ácidos biliares actúan como moléculas señalizadoras fuera de la circulación entero hepática y, como consecuencia, la modificación de la composición de los ácidos biliares por esta microbiota podría representar otro mecanismo mediante el cual dicha microbiota digestiva influye sobre el metabolismo del hospedador.

Dieta occidental, bilis y microorganismos digestivos.

Los resultados de Dekvota y col. apoyan un modelo en el que la consumición generalizada de grasa procedente de la leche provoca cambios en la producción de ácidos biliares, un crecimiento aberrante de microorganismos pro-inflamatorios y susceptibilidad genética para producir colitis. Coincidiendo con esta hipótesis, estudios previos realizados en humanos (Loubinoux y col.; Rowan y col.) han demostrado una asociación entre la enfermedad del intestino irritable y bacterias reductoras del sulfato (como *B. wadsworthia*). Los productos derivados de este metabolismo bacteriano podrían desorganizar el tejido epitelial del interior del tracto digestivo que actúa como una barrera para los patógenos y las toxinas. Esta desorganización podría magnificar los efectos de ciertas respuestas inmunes a antígenos producidas en respuesta a componentes pro-inflamatorios de la microbiota o incluso a infecciones víricas (Cadwell y col.).

LeBlanc y col., en su experimento para estudiar el papel desempeñado por la colina de la dieta en los efectos beneficiosos de la lecitina en la secreción de ácidos biliares en ratas, dividieron a estos animales en tres grupos, un grupo control, un grupo al que se le administró una dieta suplementada con colina libre, y un tercer grupo cuya dieta estaba suplementada con lecitina. El perfil de ácidos lipídicos en la bilis de las ratas de los tres grupos se muestra en la tabla 2.

Ácido biliar	Grupo control	Grupo colina	Grupo lecitina
Á. deoxicólico	5,0 ± 2,4	7,1 ± 1,0	14,0 ± 3,0
Á. cólico	64,6 ± 6,2	41,7 ± 1,7	55,2 ± 7,6
Á. α-muricólico	8,3 ± 2,1	12,2 ± 1,3	6,5 ± 2,3
Á. β-muricólico	2,2 ± 0,9	9,6 ± 1,4	0,6 ± 0,5

Tabla 2: porcentaje de ácidos biliares en la composición de la bilis en ratas alimentadas con una dieta control, una dieta suplementada con colina libre y otra dieta suplementada con lecitina.

El ácido cólico resultó ser el más abundante en todos los grupos. Sin embargo, se observó un incremento significativo en el porcentaje de ácidos muricólicos en el grupo suplementado con colina, en comparación con los otros dos grupos. Este incremento se observó conjuntamente con una disminución en el porcentaje de ácido cólico en este grupo.

La dieta de lecitina indujo un importante incremento en el porcentaje de ácido deoxicólico, lo que en parte podría explicar el aumento de la salida de fosfolípidos biliares y colesterol que se produjo con esta dieta.

Como se anticipó, cuando el ácido taurocólico fue infundido, el flujo biliar comenzó a decrecer, y hacia el final de esta infusión, era significativamente más bajo que durante el periodo basal (colestasis). Tanto la suplementación con lecitina como la suplementación con colina, en cambio, incrementaron la secreción de bilis y de ácidos biliares.

La dieta suplementada con lecitina indujo además una secreción más elevada de colesterol, comparada con el grupo control. Al contrario que el flujo de bilis, así como de la secreción de ácidos biliares y fosfolípidos en ratas, el colesterol biliar de las ratas alimentadas con la dieta suplementada con colina no fue estadísticamente diferente del procedente de las ratas alimentadas con dietas control.

El ritmo de la secreción de fosfolípidos se incrementó con la infusión de ácidos biliares hasta alcanzar un máximo anterior a la capacidad de transporte hepática máxima (BASRm). Al alcanzarlo, la salida de fosfolípidos decreció, pero aún así, después de todo la secreción de fosfolípidos en las dietas suplementadas tanto con colina como con lecitina era significativamente más alta que en el grupo control. En este grupo, tanto en condiciones basales como después de la infusión de ácido taurocólico, el fosfolípido mayoritario era la fosfatidilcolina, y los ácidos grasos principales fueron el palmítico y el linoleico.

Este estudio claramente demostró que administrando una dieta enriquecida en colina se mejoraba la excreción espontánea de bilis y el transporte de ácidos biliares, y así se reducían los efectos colestáticos de las altas concentraciones de ácidos biliares. Así, los efectos beneficiosos de las dietas enriquecidas en lecitina podrían ser atribuidos a la colina, uno de los componentes de la lecitina.

Existen muy pocos estudios acerca de la contribución de la colina de la dieta sobre la secreción de lípidos biliares y es difícil comparar este descubrimiento con estudios anteriores (Peled y col.; Robins y col.), dado que las condiciones experimentales difieren considerablemente. Sin embargo, parece que la magnitud de la secreción de los fosfolípidos biliares depende tanto de la síntesis de estos fosfolípidos, la cual está regulada por el contenido de la colina en la dieta, como de la composición de los ácidos biliares (Robins y col.).

Suplementos que mejoran los cambios en la microbiota provocados por una dieta rica en grasas.

Neyrinck y col., cuando estudiaron si la modulación de la bacteria digestiva *Roseburia* spp. por la fibra quitina-glucano mejoraba las alteraciones del hospedador provocadas por una dieta alta en grasas, llegaron a la conclusión de que la suplementación con esta fibra en las dietas altas en grasa inducía el alargamiento del ciego junto con una profunda modificación en la comunidad microbiana. Los análisis realizados demostraron que la suplementación con quitina-glucano incrementaba

modestamente las cantidades de *Bacteroides-Prevotella* spp., en tanto que el grupo de *Clostridium cocoides-Eubacterium rectale* y *Roseburia* spp. fueron completamente restaurados tras el tratamiento con la fibra.

La dieta alta en grasas incrementó de manera importante la ganancia de peso corporal, además de provocar un desarrollo más elevado de la grasa epididimal, visceral y subcutánea, en comparación con el grupo control, mientras que la dieta suplementada con quitina-glucano provocaba una ganancia de peso corporal un 28% más pequeña que la obtenida con la dieta alta en grasa. Este efecto venía acompañado con un desarrollo más bajo de la masa corporal. Además, la eficacia alimenticia (ganancia de peso dividido entre el número de calorías consumidas durante todo el tratamiento) fue bastante más baja en los ratones tratados con la fibra.

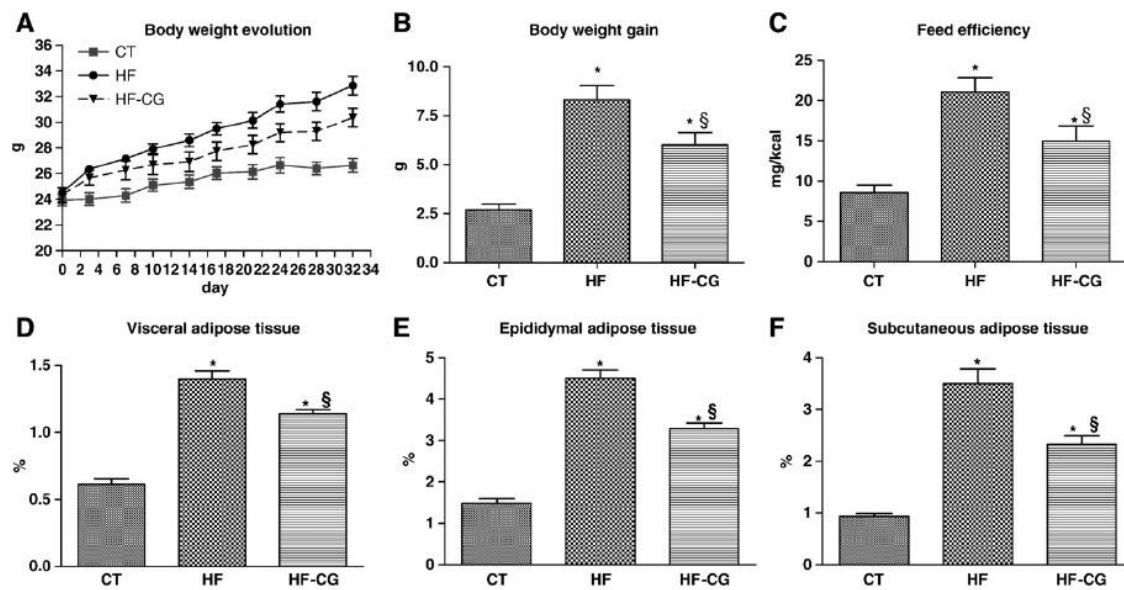


Fig 9: Evolución del peso corporal (A), ganancia de peso corporal (B), eficacia alimenticia (C), y peso de los tejidos adiposos visceral (D), epididimal (E), y subcutáneo (F) (porcentaje respecto al peso corporal total), de ratones alimentados con una dieta control (CT), una dieta alta en grasas (HF), y la misma dieta alta en grasas suplementada con quitina-glucano (HF-CG) durante cuatro semanas.

Los análisis in vitro tanto del crecimiento de las bacterias como de la producción de ácidos grasos de cadena corta en presencia de quitina-glucano, así como de las enzimas bacterianas implicadas en la descomposición de esta fibra, podrían constituir

perspectivas interesantes para elucidar los mecanismos implicados en el efecto prebiótico de la quitina-glucano.

El mismo equipo realizó un experimento parecido para estudiar los efectos prebióticos de los arabinosilanos del trigo en relación con un incremento de Bifidobacterias, *Roseburia* y *Bacteroides/Prevotella* en ratones con obesidad inducida. Observaron que la suplementación con AX inducía, de la misma forma que la quitina-glucano, un alargamiento del ciego y una gran modificación de la comunidad microbiana en comparación con la dieta alta en grasas. Además, esta suplementación con AX restauró los cambios que había inducido en la comunidad microbiana la dieta con alto contenido graso, como demostró el importante crecimiento de *Bacteroides-Prevotella* spp. y de *Roseburia* spp. Además, los arabinosilanos inducían el crecimiento específico de Bifidobacterias, en concreto de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*.

Al igual que en el experimento anterior, la suplementación con arabinosilano disminuyó la ganancia de peso corporal y el desarrollo de masa grasa con respecto a la dieta alta en contenido graso. Los ratones alimentados con la dieta alta en grasa suplementada con AX no ganaron peso tan rápidamente como los alimentados exclusivamente con la dieta alta en grasa. De hecho, la suplementación con AX decreció la ganancia de peso corporal en un 40% (frente al 28% con que lo hacía la quitina-glucano) en comparación con la dieta rica en grasa. Además, el tratamiento con arabinosilanos indujo un menor desarrollo de la masa grasa como se pudo comprobar midiendo el peso de los tejidos adiposos epididimal, visceral y subcutáneo.

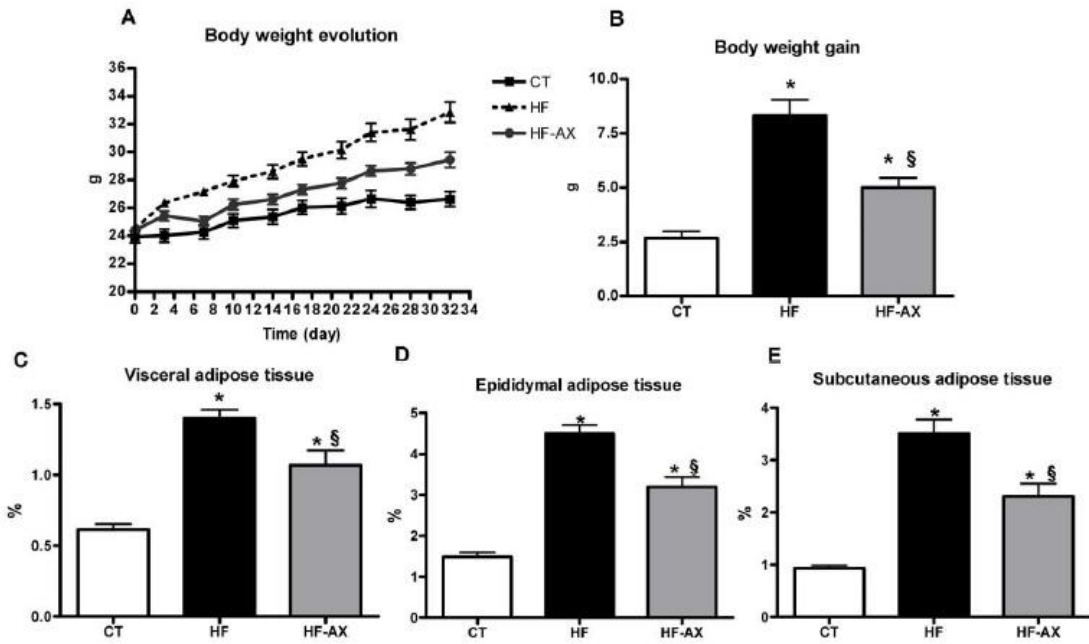


Fig 10: Evolución del peso corporal (A), ganancia de peso corporal (B), y pesos de los tejidos adiposos visceral (C), epididimal (D) y subcutáneo (E) (porcentaje con respecto al peso corporal total) de ratones alimentados con una dieta estándar (CT), una dieta alta en grasas (HF) o la misma dieta alta en grasas suplementada con arabinosilano (HF-AX) durante cuatro semanas.

Además de todos estos efectos, la suplementación con arabinosilano mejoró el índice de insulinoresistencia y los niveles de colesterol.

Incluso siendo una extrapolación de este estudio a nivel humano todavía cuestionable, dadas las diferencias en las estructuras del tracto digestivo y en la microbiota, estos resultados sugieren que los arabinosilanos, fibras de alto peso molecular que en su mayoría se encuentran en el endosperma del trigo, podrían conferir impactos positivos en la salud a través de la modulación de la microbiota digestiva y podrían constituir una alternativa natural en la prevención de la obesidad y las enfermedades cardiovasculares.

Los resultados obtenidos por Everard y col. muestran que en ratones *ob/ob*, la alimentación con prebióticos disminuía el filo de Firmicutes y aumentaba el de Bacteroidetes. Además, los prebióticos mejoraban la tolerancia a la glucosa, aumentaban el número de células L intestinales y sus parámetros asociados (expresión

de mRNA de proglucagón y niveles de GLP-1 en plasma), y reducía el desarrollo de masa grasa, el estrés oxidativo y la inflamación leve. En ratones alimentados con dietas de elevado contenido graso, el tratamiento con prebióticos mejoraba la sensibilidad a la leptina y los parámetros metabólicos.

Everard y col. hallaron que el tratamiento con prebióticos aumentaba significativamente la abundancia de *Bifidobacterium* spp, además de *E. rectale* y *C. coccoides*. Además, la abundancia de Firmicutes y de *Roseburia* spp. disminuyó después del tratamiento, mientras que la abundancia de *Bacteroidetes-Prevotella* y el total de bacterias de la comunidad no fueron afectados por dicho tratamiento.

Se observó también un gran intercambio en la abundancia a nivel de filo entre Bacteroidetes y Firmicutes, de los cuales la abundancia aumentó y disminuyó respectivamente (es decir, se produjo una disminución del ratio Firmicutes/Bacteroidetes), después del tratamiento con el prebiótico, en comparación con el grupo control.

Además, los análisis llevados a cabo mostraron claramente que las comunidades bacterianas cecales de los ratones obesos tratados con prebiótico eran más similares entre ellas que a las comunidades de los 10 individuos del grupo control (también obesos).

Así mismo, los prebióticos mejoraron el metabolismo de la glucosa y los lípidos en ratones obesos. Los cambios en la composición de la microbiota fueron asociados con una glicemia significativamente más baja en periodo de ayuno y una marcada mejora en la tolerancia a la glucosa. Sin embargo, debe destacarse que el peso corporal no se vio significativamente afectado por este tratamiento, pero la masa grasa sí que resultó ser bastante más baja en los ratones tratados que en los ratones control.

Aunque los datos obtenidos por Everard y col. se basan en diferentes tecnologías y métodos de identificación de rDNA, la composición de las comunidades bacterianas resultó similar, reforzando la idea de que los prebióticos inducen cambios profundos en la composición de la microbiota digestiva. Estos descubrimientos desafían el concepto de que los prebióticos afectan solo a una pequeña parte de la comunidad microbiana del tracto digestivo.

El estudio llevado a cabo por Everard y col. demuestra que la toma de prebióticos en ratones produce un impacto en la abundancia relativa de los dos filos dominantes en el tracto digestivo, Bacteroidetes y Firmicutes, de una manera similar al cambio observado cuando se comparan ratones o humanos normales con obesos.

Relación entre distintos patrones dietéticos y enterotipos microbianos.

El experimento realizado a corto plazo por Wu y col., controlando los diferentes tipos de dieta tomados por los sujetos de estudio, fue llevado a cabo para estudiar la estabilidad de la microbiota digestiva y las asociaciones nutriente-microbiota observadas. Diez sujetos fueron retenidos y alimentados al azar con una dieta rica en grasas y baja en fibra, o con una dieta baja en grasas y rica en fibra. Los análisis realizados en muestras de heces mostraron que una dieta a corto plazo no suponía variaciones entre sujetos.

Sin embargo, las dietas a largo plazo influyen sobre la estructura y la actividad de los trillones de microorganismos que residen en el tracto digestivo humano (Muegge y col.; Duncan y col.; Ley y col.; Walker y col.), pero sin embargo, después del experimento mencionado anteriormente, para Wu y col. aún permanecía indeterminado a qué velocidad y de qué forma la microbiota del tracto digestivo de los humanos respondía a un cambio a corto plazo en los macronutrientes. Para aclarar este punto, llevaron a cabo otro estudio en el cual demostraron que el consumo de dietas basadas enteramente tanto en ingredientes animales como vegetales a corto plazo, altera la estructura de la comunidad microbiana y pronuncia las diferencias entre individuos en cuanto a la expresión genética microbiana.

La dieta basada en animales incrementó la abundancia de los microorganismos tolerantes a los ácidos biliares (*Alistipes*, *Bilophila* y *Bacteroides*), y disminuyó el nivel de los Firmicutes, que metabolizan los polisacáridos de las plantas procedentes de la dieta (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* y *Ruminococcus bromii*).

Finalmente, el aumento tanto de la abundancia como de la actividad de *Bilophila wadsworthia* observado en la dieta basada en animales apoya la relación entre la grasa

de la dieta, los ácidos biliares y el sobrecrecimiento de microorganismos capaces de desencadenar la enfermedad del intestino irritable (Dekvota y col.). En concreto, estos resultados demuestran que la microbiota digestiva puede responder rápidamente a una dieta alterada, potenciando la diversidad de estilos de vida en cuanto a la dieta.

Un estudio reciente comparó la microbiota fecal de niños procedentes de una zona rural de África con la de niños pertenecientes a una zona urbana de Italia (De Filippo y col.). Los niños africanos se alimentaban a base de una dieta rural tradicional africana que es baja en grasa y proteína animal y rica en almidón, fibra y polisacáridos de las plantas. De manera opuesta, los niños italianos comían una típica dieta occidental.

El estudio halló un gran número de Bacteroidetes y una disminución de Firmicutes en los niños africanos, con una abundancia única de bacterias de los géneros *Prevotella* y *Xylanibacter* (ambas Bacteroidetes), capaces de fermentar la celulosa y el xilano, abundantes en la dieta africana. En contraste, los niños italianos albergaban una microbiota digestiva de proporción estándar (Firmicutes : Bacteroidetes - 3:1).

Además, los análisis revelaron una biodiversidad bacteriana más rica en los niños africanos que en los europeos. Estos resultados concuerdan con el efecto esperado de los ácidos biliares, si asumimos que la concentración de ácidos biliares es más baja en los niños de África que en los de Italia debido al tipo de dieta.

Un dato interesante es que *Prevotella* ha sido hallada de forma predominante en la comunidad microbiana presente en el rumen de los rumiantes (Bekele y col.), en la cual hay ausencia de ácidos biliares.

También es tentador especular que un gradiente de concentración de ácidos biliares en el intestino desde carnívoros (alto), omnívoros (intermedio) y herbívoros (bajo), creado por diferencias dietéticas, determina en parte la riqueza filogenética de las respectivas microbiotas gastrointestinales reportadas en cada grupo de mamíferos: carnívoros (baja), omnívoros (intermedia) y herbívoros (alta) (Ley y col.).

Conclusiones y discusión.

Utilizando experimentos simples en un modelo de ratas, todos estos estudios muestran el hasta ahora desconocido papel de los ácidos biliares como un factor del hospedador que controla la población de la microbiota digestiva *in vivo*. Esta ha sido una pregunta sin responder desde los inicios del siglo pasado, momento en el que se descubrió la actividad antimicrobiana de los ácidos biliares (Stacey y col.), aunque la acción bactericida de estos ácidos sobre las bacterias intestinales típicas ha sido examinada en bastantes ocasiones *in vitro* (Kurdi y col.; Floch y col.).

Es interesante señalar que la modificación observada en la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes en la microbiota digestiva desencadenada por la suplementación con ácido cólico es similar a los cambios a nivel de filo de esta población provocados por una dieta alta en grasas inducida en un modelo de ratón. Debido a que la grasa de la dieta incrementa la secreción de bilis, puede especularse que estas alteraciones en la población bacteriana fueron promovidas por un incremento en los niveles de ácido deoxicólico producido por un aumento de la ingesta de grasa.

Además, parece ser que los ácidos biliares afectan a la salud del hospedador modulando la secreción de adiponectina.

Estos descubrimientos abren nuevas puertas hacia un mejor entendimiento de la relación entre el síndrome metabólico y la población microbiana del tracto digestivo.

La demostración del papel llevado a cabo por la microbiota digestiva en el mantenimiento de la salud humana llevó a la comunidad científica a considerar los medios por los cuales esta microbiota podría ser manipulada. Diferentes mecanismos complementarios pueden ser propuestos para explicar el cambio metabólico en el almacenamiento de energía. El primer mecanismo descrito consiste en el papel de la microbiota digestiva para incrementar la capacidad de aprovechar la energía procedente de la dieta. El segundo mecanismo consiste en el papel de esta microbiota para modular el nivel de lipopolisacáridos en el plasma, lo cual desencadena la inflamación y el comienzo de la obesidad y la diabetes de tipo 2.

No obstante, un gran número de preguntas permanece sin resolver: ¿cómo y por qué la composición de la microbiota digestiva podría estar asociada con la obesidad y otros desórdenes nutricionales? ¿De qué manera la modulación específica de las bifidobacterias disminuye los niveles de los lipopolisacáridos en el plasma y sus consecuencias metabólicas? ¿Podemos proponer estrategias específicas para modificar la microbiota, en favor por ejemplo de las bifidobacterias, para reducir el impacto de la alimentación con contenido graso elevado sobre la producción de enfermedades metabólicas en humanos? De este modo, estrategias específicas para modificar la microbiota del tracto digestivo podrían constituir herramientas útiles para reducir el impacto de estas dietas altas en grasas en el desencadenamiento de las enfermedades metabólicas.

Así, aunque aún necesitamos determinar si los ácidos biliares realmente pueden considerarse como un determinante importante a la hora de modificar la microbiota digestiva, especialmente en una dieta rica en grasas, estos descubrimientos proporcionan una nueva perspectiva para entender la etiología de las enfermedades metabólicas, incluyendo la obesidad, la enfermedad del intestino irritable y el cáncer de colon relacionadas con la disbiosis.

Estos estudios subrayan el papel clave que los ácidos biliares pueden tener en la modificación de la microbiota digestiva. Sin embargo, se necesita más trabajo para averiguar si y cómo el pool de ácidos biliares se ve afectado por varias perturbaciones como los cambios en la dieta, cirugías gástricas, probióticos y medicamentos. También será importante determinar cómo los microorganismos digestivos pueden resistir o incluso metabolizar los ácidos biliares, y hasta qué punto la variación individual de la estructura y la función de la comunidad microbiana podría influir sobre los microorganismos perjudiciales como *B. wadsworthia* o sobre la predisposición a enfermedades.

Bibliografia.

- Arumugam M, et al. Nature. (2011)

- Barnwell SG, Tuchweber B, Yousef IM, Biochim. Biophys. Acta 992 (1987)

- Bekele AZ, Koike S, Kobayashi Y. *Genetic diversity and diet specificity of ruminal Prevotella revealed by 16S rRNA gene-based analysis*. FEMS Microbiol Lett (2010)

- Cadwell, K. et al. Cell (2010).

- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes (2007)

- Cani PD, Delzenne NM. *Role of gut microbiota in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding*. Elsevier (2007).

- Cani PD, Delzenne NM. *The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease*. Curr Pharm Des (2009)

- Cani PD, Delzenne NM. *Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota*. Curr Opin Pharmacol (2009)

- Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia*. Diabetologia (2007)

- Cani PD, Possemiers S, Van de WT, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. Gut (2009)

- Coleman R, Rahman K, Biochim. Biophys. Acta 1125 (1992)

- Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N. *Dietary intervention impact on gut microbial gene richness*. Nature (2013).
- Cox LM, Cho I, Young SA, Anderson WHK, Waters BJ. *The nonfermentable dietary fiber hydroxypropyl methylcellulose modulates intestinal microbiota*. The FASEB Journal. (2013).
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE. *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. Nature (2014).
- Dekvota S, Wang Y, Musch M, Leone V. *Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in $\text{IL10}^{-/-}$ mice*. Nature. (2012).
- Delzenne NM. *Oligosaccharides: state of the art*. Proc Nutr Soc (2003)
- Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss*. Int J Obes (Lond) (2008)
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science (2005)
- Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M. *Responses of gut microbiota on glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistance mice*. Diabetes (2011).
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A (2010)
- Floch MH, Gershengoren W, Elliott S, Spiro HM. *Bile acid inhibition of the intestinal microflora--a function for simple bile acids?* Gastroenterology (1971).
- Floch MH, Binder HJ, Filburn B, et al. *The effect of bile acids on intestinal microflora*. Am J Clin Nutr (1972)

- Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, et al. *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci USA (2007)

- Gregory DH, Vlahcevic ZR, Scharzki P, Swell L. Clin. Invest. 55 (1975)

- Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, et al. *High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity*. Gastroenterology (2009)

- Hooper LV, Gordon JI. Science. (2001)

- Hughes SA, Shewry PR, Li L, Gibson GR, Sanz ML, et al. *In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans*. J Agric Food Chem (2007)

- Islam K, Fukiya S, Hagio M, Fujii N. *Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats*. Gastroenterology (2011).

- Kawamoto T, Mao SJ, Russo NF, Gastroenterology 92 (1987)

- Kurdi P, Kawanishi K, Mizutani K, et al. *Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria*. J Bacteriol (2006)

- Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, et al. *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS ONE (2010)

- LeBlanc MJ, Gavino V, Pérea A, Yousef I. *The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats*. Elsevier (1998).

- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A (2005)

- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. *Evolution of mammals and their gut microbes*. Science (2008)
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature (2006)
- Lopez HW, Levrat MA, Guy C, Messenger A, Demigne C, Remesy C *Effects of soluble corn bran arabinoxylans on cecal digestion, lipid metabolism, and mineral balance (Ca, Mg) in rats*. J Nutr Biochem (1999)
- Loubinoux, J., Bronowicki, J. P., Pereira, I. A., Mouguel, J. L. & Faou, A. E. FEMS Microbiol. Ecol. 40, (2002).
- Lowe PJ, Barnwell SG, Coleman R, Biochem. (1984)
- Lu ZX, Walker KZ, Muir JG, Mascara T, O’Dea K *Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subjects*. Am J Clin Nutr (2000)
- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach*. Gut (2006)
- Martínez I, Wallace G, Zhang C, et al. *Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota*. Appl Environ Microbiol (2009)
- Midtvedt T. *Microbial bile acid transformation*. Am J Clin Nutr (1974)
- Muegge BD, et al. *Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans*. Science. (2011)

- National Research Council. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet* (The National Academies Press, 2007).

- Neyrinck AM, Delzenne NM. *Potential interest of gut microbial changes induced by non-digestible carbohydrates of wheat in the management of obesity and related disorders*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2010)

- Neyrinck AM, Possemiers S, Verstraete W. *Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (Roseburia spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice*. Elsevier (2010).

- Neyrinck AM, Possemiers S, Druart C, Van der Wiele T. *Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in Bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice*. *PLoS One*. (2011).

- Polichetti E, Diaconescu N, Malli L, Portugal H, Pauli AM, Tuchweber B, Yousef IM, Chanussot F, *Br. J. Nutr.* (1996)

- Portal I, Clerc T, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Lafont H, Tuchweber B, Yousef IM, Chanussot F, *Am. J. Physiol.* (1993)

- Peled Y, Gilat T, *Hepatology* (1994)

- Qin, J. et al. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *Nature* (2010).

- Reddy BS. *Diet and excretion of bile acids*. *Cancer Res* (1981)

- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. *Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria*. *J Lipid Res* (2006)

- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D. & Handelsman, J. *Metagenomics: genomic analysis of microbial communities*. *Annu. Rev. Genet.* (2004)

- Rioux F, Perea A, Yousef IM, Levy E, Malli L, Carrillo M, Tuchweber B, Biochim. Biophys. (1994)
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, et al. *Prebiotic effects: metabolic and health benefits*. Br J Nutr (2010)
- Robins SJ, Armstrong MJ, Gastroenterology (1976)
- Rowan, F. E., Docherty, N. G., Coffey, J. C. & O'Connell, P. R. Br. J. Surg. (2009)
- Stacey M, Webb M. *Studies on the antibacterial properties of the bile acids and some compounds derived from cholanic acid*. Proc R Soc Lond B (1947)
- Swann J, Want E, Geier F, Spagou K, Wilson I, Sidaway J. *Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments*. (2010).
- Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, et al. *Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core*. Environ Microbiol (2009)
- Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, et al. *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome*. Cell Host Microbe (2008)
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature (2006)
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, et al. *The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice*. Sci Transl Med (2009).
- Vlahcevic E, Gurley O, Heuman DM, Hylemon PB, J. Lipid Res. 31 (1990)
- Wu GD, et al. BMC Microbiol. (2010)
- Wu GD, Chen J, Hoffman C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA. *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science (2011).

- Yokota A, Fukiya S, Islam KMB, Ooka T, Ogura Y. *Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet?* Gut Microbes, (2012)

- Yousef IM, Barnwell SG, Gratton F, Tuchweber B, Am. J. Physiol. (1987).

- Yousef IM, Fisher MM, Piekarski J, Holub BJ, Lipids (1977)