

De la bodega a la regulación del tránsito intestinal: Vino, Microbiota humana y Función Digestiva



M. Victoria Moreno-Arribas
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
(CIAL) (CSIC-UAM)



PTV
PLATAFORMA
TECNOLÓGICA
DEL VINO

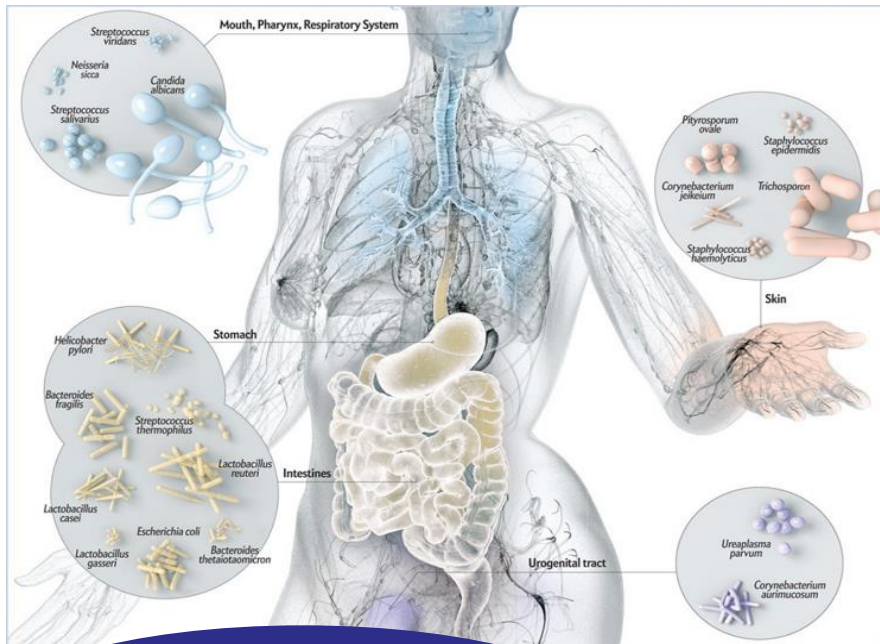
29 de enero de 2015

CIAL

 **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

 **UAM**
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

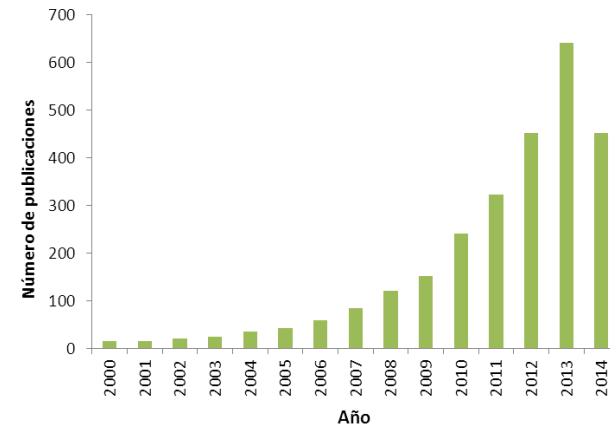
MICROBIOTA HUMANA



90% de las células de organismo

Human Microbiome Project (Turnbaugh et al., 2007)

References for “Human & Microbiota & Health” (ISI Web of Knowledge)



HUMAN HEALTH

MICROBIOTA & NUTRIENTES



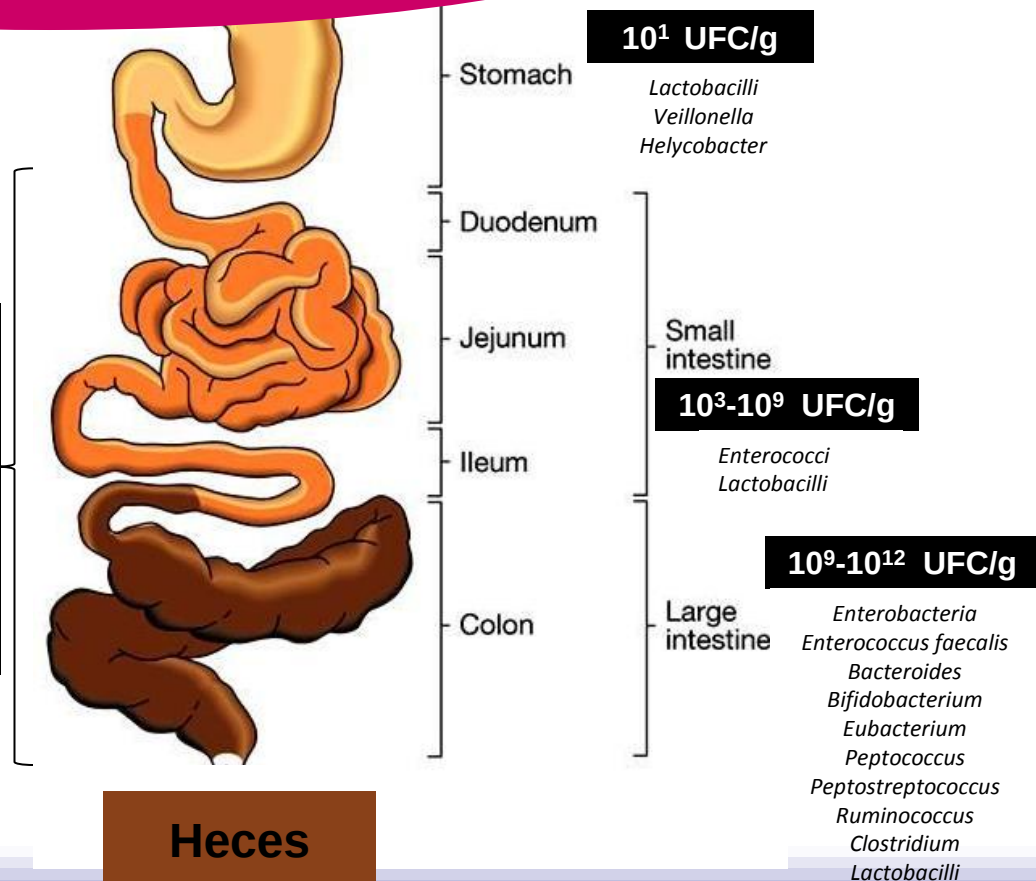
MICROBIOTA INTESTINAL

Gran variabilidad interindividual

Dieta, edad, estilo de vida, factores ambientales, enfermedades, etc.

Filos predominantes intestino:

Firmicutes
Bacteroidetes
Actinobacteria
Proteobacteria



Funciones de la microbiota intestinal

Estructura

Energy source (Enterocytes): SCFA's
Epithelial cell growth and differentiation
Intestinal vili and crypts development
Mucus layer

Defensa

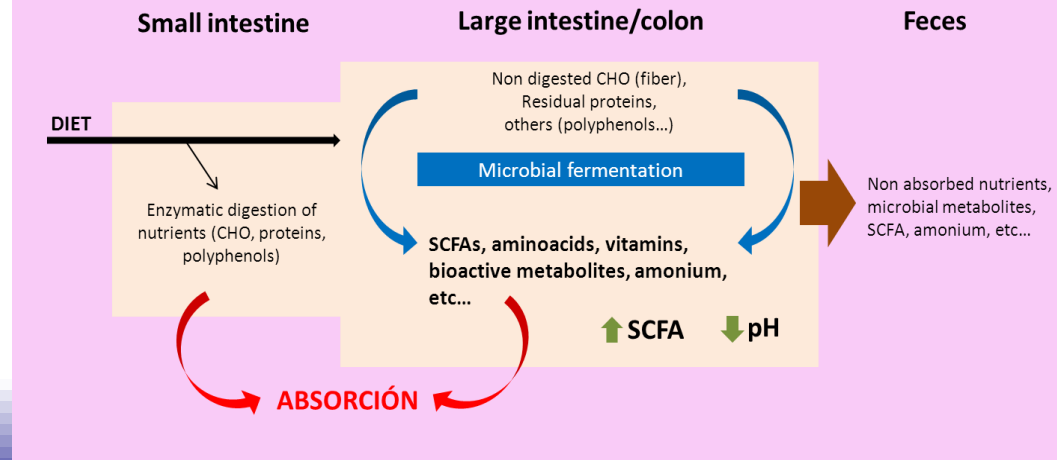
Colonization resistance
Antimicrobials secretion
Immunity development
Inflamamtory cytokine regulation

Nutrición

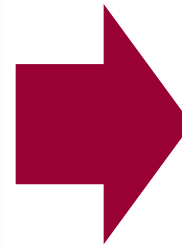
Fermentation of non-digestible substrates
Production of SCFA's (Energy)
Nutrients metabolism
Production of vitamins, FA, AA.
Digestion of dietary carcinogens

“Órgano”
metabólico

Backhed et al. (2004)

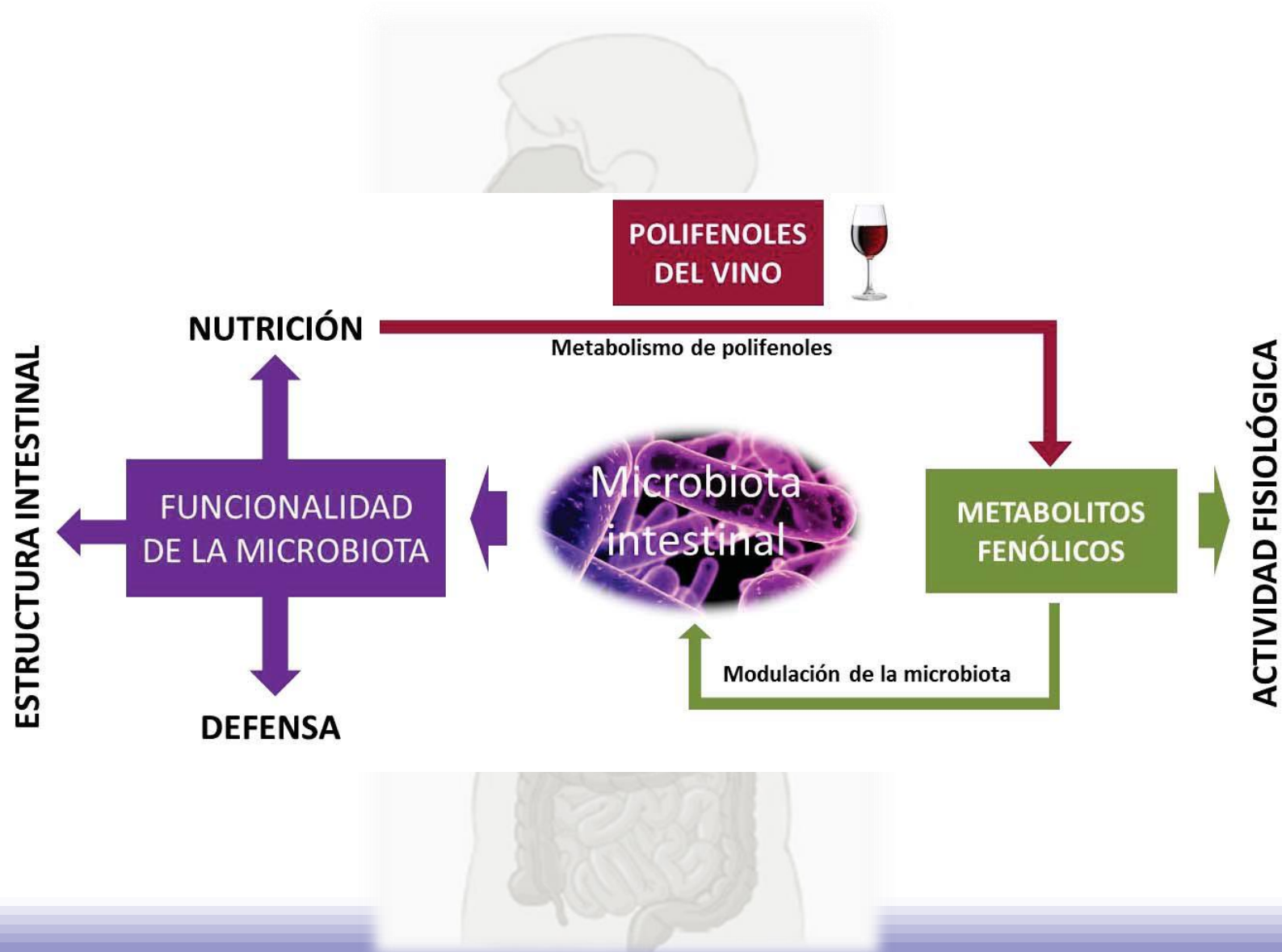


Dada la importancia que la microbiota tiene en la salud, y sabiendo que la dieta es uno de los factores que más influyen en la misma



¿efecto del consumo moderado de vino sobre la microbiota intestinal, y en consecuencia, sobre la salud digestiva?

INTERACCIÓN ENTRE LA MICROBIOTA & VINO (POLIFENOLES)



OBJETIVO

Profundizar en los efectos del consumo moderado de vino sobre la microbiota oral e intestinal, y de cómo contribuye al mantenimiento de la función digestiva, mediante la ejecución de estudios de intervención nutricional en humanos y el empleo de modelos de simulación *in vitro*:

- Metabolismo fenólico y metaboloma fecal
- Composición y función de la microbiota oral e intestinal
- Modulación de la respuesta inmunitaria intestinal



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

AGL2012-40172-C02-01

INNPACTO IPT-2012-0130-060000

TORRES



1870



BODEGA MATARROMERA

Proyecto INNPACTO IPT-2012-0130-060000. ‘Desarrollo de un nuevo producto con características saludables mejoradas a partir de subproductos de vinificación. Optimización y escalado del proceso de obtención y estudio de su metabolismo y efectos en modelos *in vitro* e *in vivo*’. MINECO (2013-2015)

- **Bodega MATARROMERA S.L.:** Purificación y fraccionamiento de los extractos de uva ricos en polifenoles. Optimización del proceso de obtención
- **Universidad de Salamanca (Dr. Celestino Santos-Buelga):** caracterizar los compuestos extraídos y determinar su bioactividad empleando el modelo animal *Caenorhabditis elegans*
- **Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM:** estudios del metabolismo fenólico intestinal y de los cambios de la microbiota colónica mediante el empleo de un Simulador Dinámico del Tracto Gastrointestinal (SIMGI)

El objetivo final es desarrollar fórmulas optimizadas que posteriormente podrán ser utilizadas como nutraceuticos y en el campo de la cosmética natural

Simulador Dinámico del Tracto Gastrointestinal (SIMGI)



TIM-1 & TIM-2 (Minekus et al.,1995)
SHIME (Molly et al.,1993)

- A) Estómago
- B&C) Control Automático
- D) Intestino delgado
- E) Colon ascendente
- F) Colon trasverso
- G) Colon descendente
- H) Bombas

✓ **Primera aplicación a alimentos (Vino tinto):**

Cueva et al. Application of a new in vitro Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of wine in colonic metabolism, *Food Res Int.*, accepted



Intervención en humanos

Heces

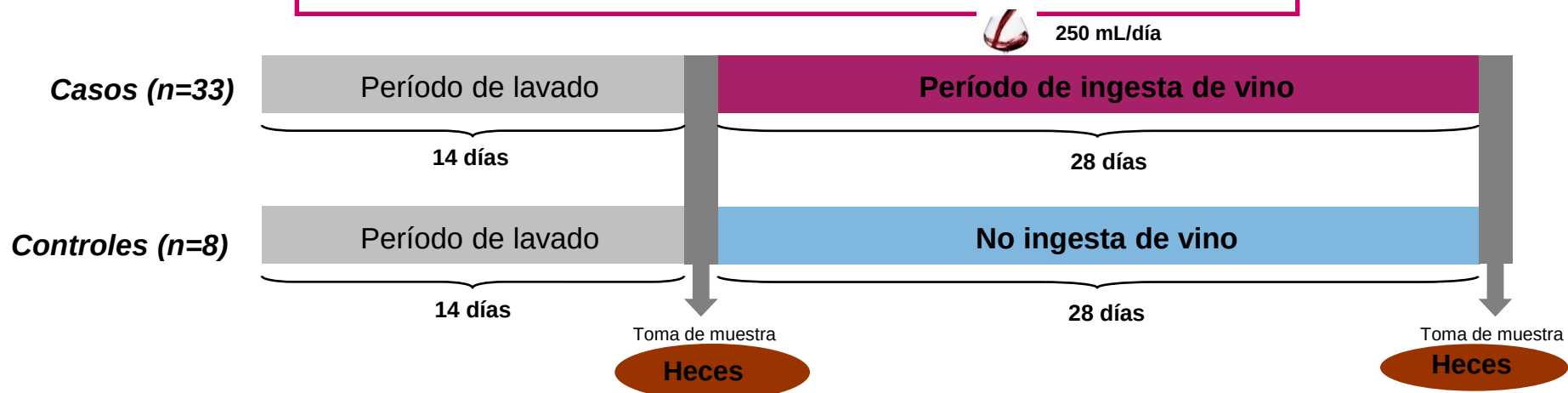
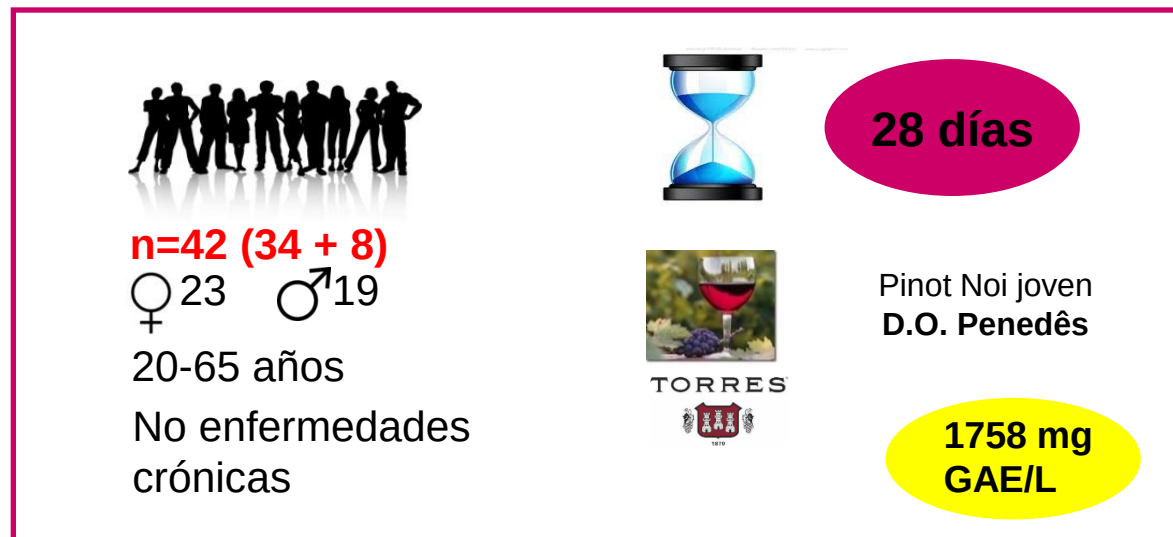
Efecto del consumo moderado de vino en el perfil de metabolitos en heces:

- **ESTUDIO DIRIGIDO:**
Análisis de metabolitos fenólicos
- **ESTUDIO NO DIRIGIDO:**
Metaboloma fecal

Efecto del consumo moderado de vino en la función intestinal:

- **COMPOSICIÓN MICROBIOTA FECAL:**
Aproximación Metagenómica
- **RESPUESTA INMUNE INTESTINAL**
Marcadores de inflamación

ESTUDIO DE INTERVENCIÓN EN HUMANOS



ANÁLISIS DIRIGIDO

UPLC-ESI-MS/MS



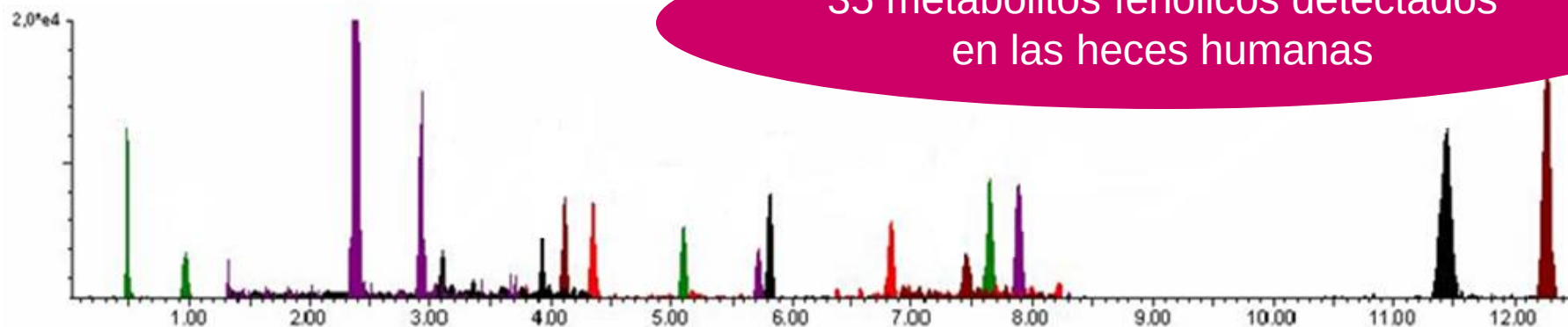
Sánchez-Patán et al. (2011)

Jiménez-Girón et al. (2013)

60 targeted metabolites

- ✓ Mandelic acids
- ✓ Phenols
- ✓ Hippuric acids
- ✓ Valerolactones
- ✓ Benzoic acids
- ✓ Phenilacetic acids
- ✓ Phenilpropionic acids
- ✓ Valeric acids
- ✓ Cinnamic acids

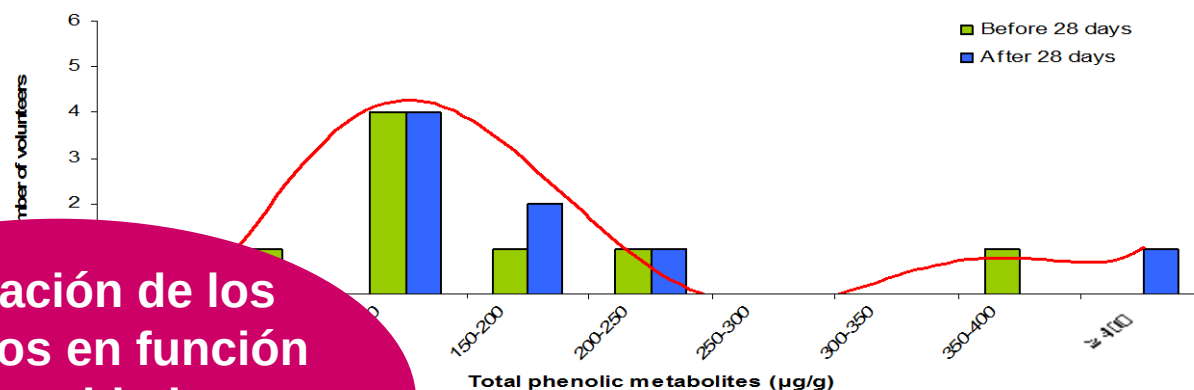
Perfil de metabolitos fenólicos



35 metabolitos fenólicos detectados
en las heces humanas

El consumo moderado de vino parece promover el metabolismo de los polifenoles en el tracto digestivo

GRUPO CONTROL

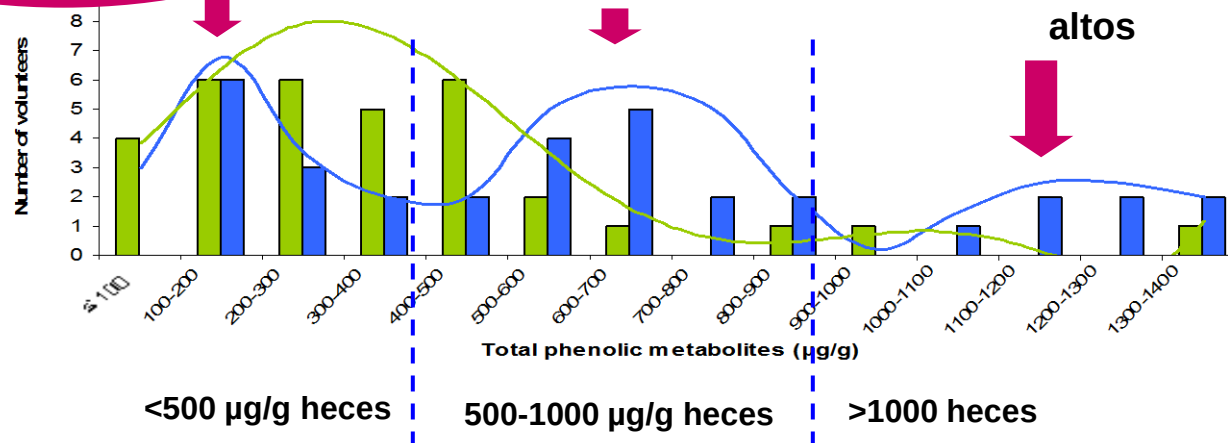


Clasificación de los voluntarios en función de su capacidad para metabolizar los polifenoles del vino

GRUPO INTERVENTION

Metabolizadores moderados

Metabolizadores altos



De acuerdo con los resultados obtenidos con otras fuentes de polifenoles. Se ha propuesto el término 'fenotipos de metabolismo fenólico' p 'metabotipos' para referirse a individuos con perfiles metabolicos similares (Bolca et al., 2013)

UHPLC TOF-MS

Infinity 1290
LC (Agilent)

Q-TOF 6540
(Agilent)



 MZmine 2

- Mass detection
- Chromatogram builder
- Chromatogram deconvolution
- Alignment of replicates
- Alignment of samples
- Filtering (peaks in at least 75% of samples)

82 muestras x 468 metabolitos

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- PCA: samples no discriminated
- Shapiro Wilk's test: no normal distribution
- Wilcoxon: 70 metabolic features ($P < 0.05$)

Zorbax Eclipse Plus C8
(2.1 mm X 100 mm, 1.8 μ m)

Reverse phase

ESI negative ion mode

50-1100 m/z

37 metabolitos $\rightarrow$ **23 aumentaron**
 $\rightarrow$ **14 disminuyeron**



Clasificación de los compuestos identificados

A) Compuestos del vino

- 2-Hydroxyglutaric acid
- 2-Methylbutyric acid
- 2,3-Pentanedione
- Diethylmalonate
- 2-Phenethyl butyrate
- 2-Phenylethyl hexanoate

AUMENTARON

B) Metabolitos microbianos

- 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone
- 4-Hydroxy-5-(3'-hydroxyphenyl) valeric acid
- 4-Hydroxy-5-(phenyl) valeric acid
- Benzoic acid

AUMENTARON

- 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid

DISMINUYERON

C) Metabolitos endógenos y/o derivados de otras vías de nutrientes

- Glutaric acid
- Docosahexaenoic acid methyl ester
- Deoxycholic acid
- Cholesterol sulfate

AUMENTARON

- Xanthine
- Urobilinogen
- Stercobilin
- Tricarballic acid
- Sulfolithocholic acid

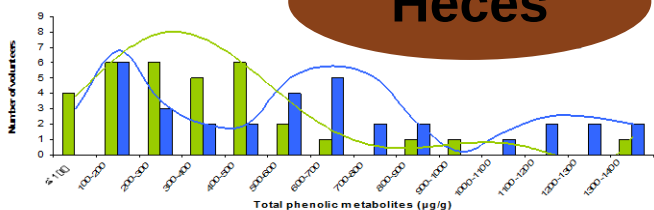
DISMINUYERON

Pasaje intacto de algunos componentes del vino a través del tracto gastrointestinal

El consumo de vino modifica el perfil fenólico fecal

El consumo de vino tiene impacto en otras vías de nutrientes (i.e., lípidos) y metabolitos endógenos (i.e., xantina y bilirrubina)

Heces



metabolizers
(n=5)

Moderate
metabolizers
(n=5)

High
metabolizers
(n=5)

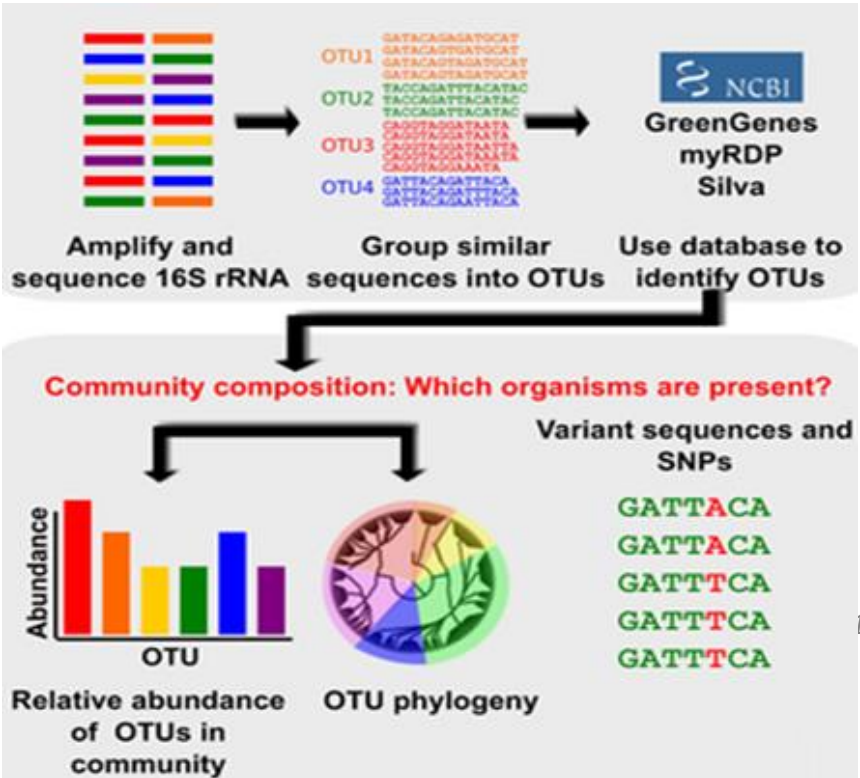
Controls
(n=5)

DNA EXTRACTION



Illumina MiSeq

Pyrosequencing data of PCR amplicons derived from hypervariable regions of 16S rRNA gene

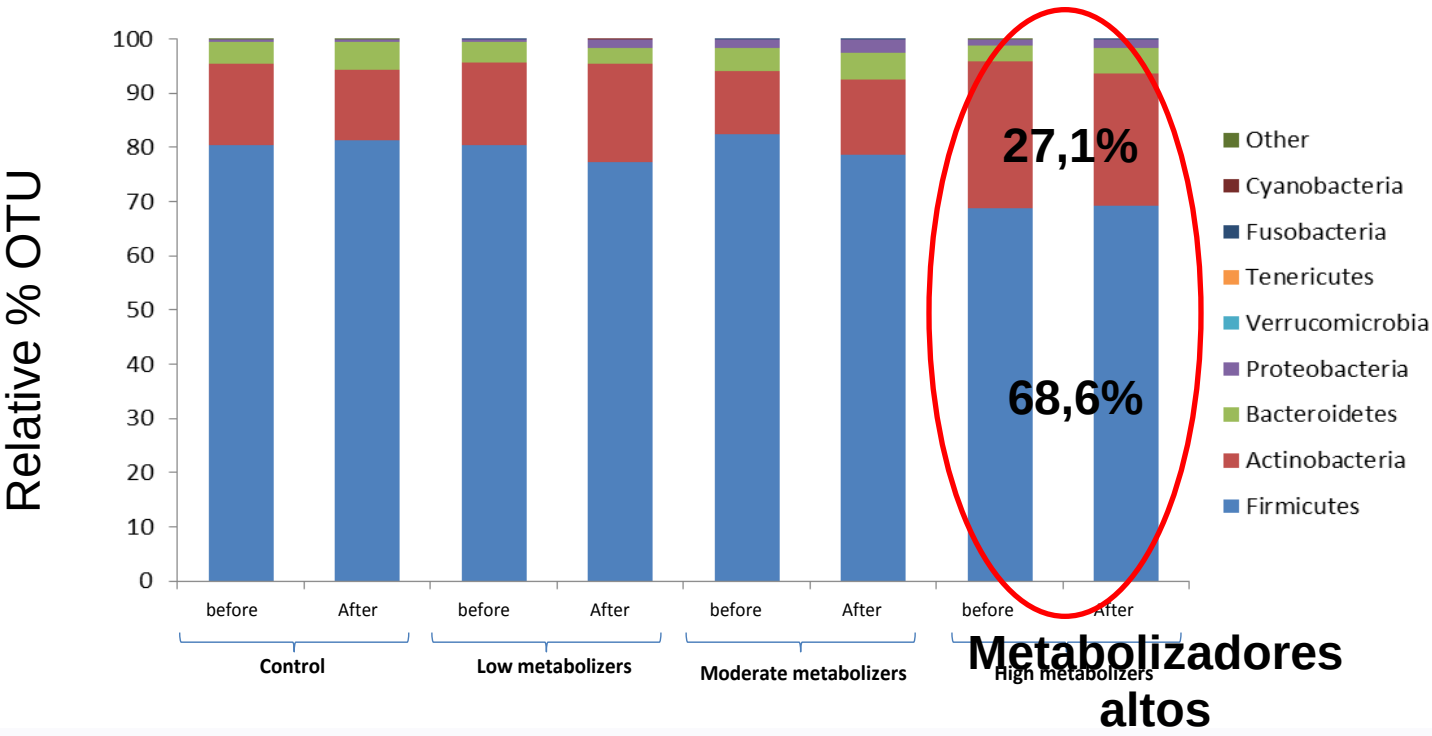


Ingesta de vino



No se encontraron cambios significativos en la proporción de las unidades taxonómicas más abundantes en las heces

Microbiota fecal a nivel de filo/género:



Composición de la microbiota fecal a nivel de especie:

	WINE CONSUMERS		
	Low metabolizers	Moderate metabolizers	High metabolizers
Uncultured Spartobacteria bacterium	0.3±0.3b	0.0±0.0a	0.0±0.0a
Clostridiales bacterium 10-3b	5.9±4.2b	0.0±0.0a	1.2±1.6a
Streptococcus parasanguinis	46.4±24.3b	14.8±28.3a	1.4±1.3a
Ruminococcus sp. CO27	8.0±6.2b	1.2±0.0a	2.2±1.5a
Staphylococcus aureus	3.5±3.4b	0.0±0.0a	0.0±0.0a
Escherichia sp. SW86	0.0±0.0a	0.3±0.3b	0.0±0.0a
Bifidobacterium ruminantium	5.6±7.5a	1.7±1.5a	59.6±54.6b
Uncultured Clostridiales bacterium	23.8±27.3a	152.3±0.1163b	36.0±47.7a
Bifidobacterium sp. 113	8.9±9.9a	3.4±4.1a	44.5±34.6b
Uncultured Staphylococcus sp.	7.9±4.9b	2.1±3.1a	0.2±0.2a
Uncultured Clostridiales Family XIII bacterium	0.3±0.4b	1.0±0.8b	0.0±0.0a
Streptococcus sp. oral clone BP2-57	0.0±0.0a	0.1±0.1a	0.8±0.7b
Uncultured Dechloromonas sp.	0.0±0.0a	0.6±0.4b	0.1±0.3a
Uncultured Comamonas sp.	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.4±0.4b
Clostridium sp. enrich cult clone VN_TX2-19	0.4±0.5b	0.0±0.0a	0.0±0.0a
Collinsella tanakaei	0.0±0.0a	119.0±88.9b	15.5±34.6a
Actinomyces naeslundii	1.0±0.0005b	0.0±0.0a	0.8±0.9b
Actinobaculum sp. oral taxon 183	0.4±0.5a	1.4±1.1b	0.2±0.3a
Actinomyces sp. oral clone CT068	1.1±0.7b	0.1±0.3a	0.5±0.6ab

Composiciones diferentes de la microbiota intestinal pueden expresar rasgos/atributos funcionales comunes en el metabolismo de los polifenoles del vino, lo que se conoce como ‘metabotipos’, ya descritos para otras fuentes

Análisis de marcadores inmunes: multiplex immunoassay

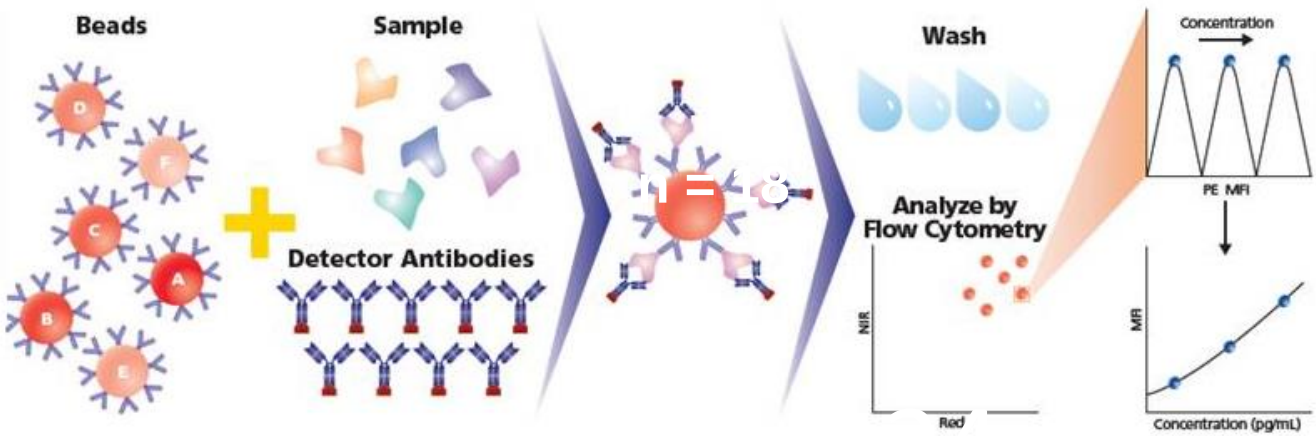


Bio-Plex Pro Human Cytokine Plex Panel		Bio-Plex Pro Human Isotyping Panel
G-CSF	IL-8	IgE
GM-CSF	IL-10	IgM
IFN- γ	IL-12 (p70)	IgG ₁
IL-1 β	IL-13	IgG ₁
IL-2	IL-17	IgG ₁
IL-4	MCP-1	IgG ₁
IL-5	MIP-1 β	
IL-6	TNF- α	
IL-7	GRO- α	

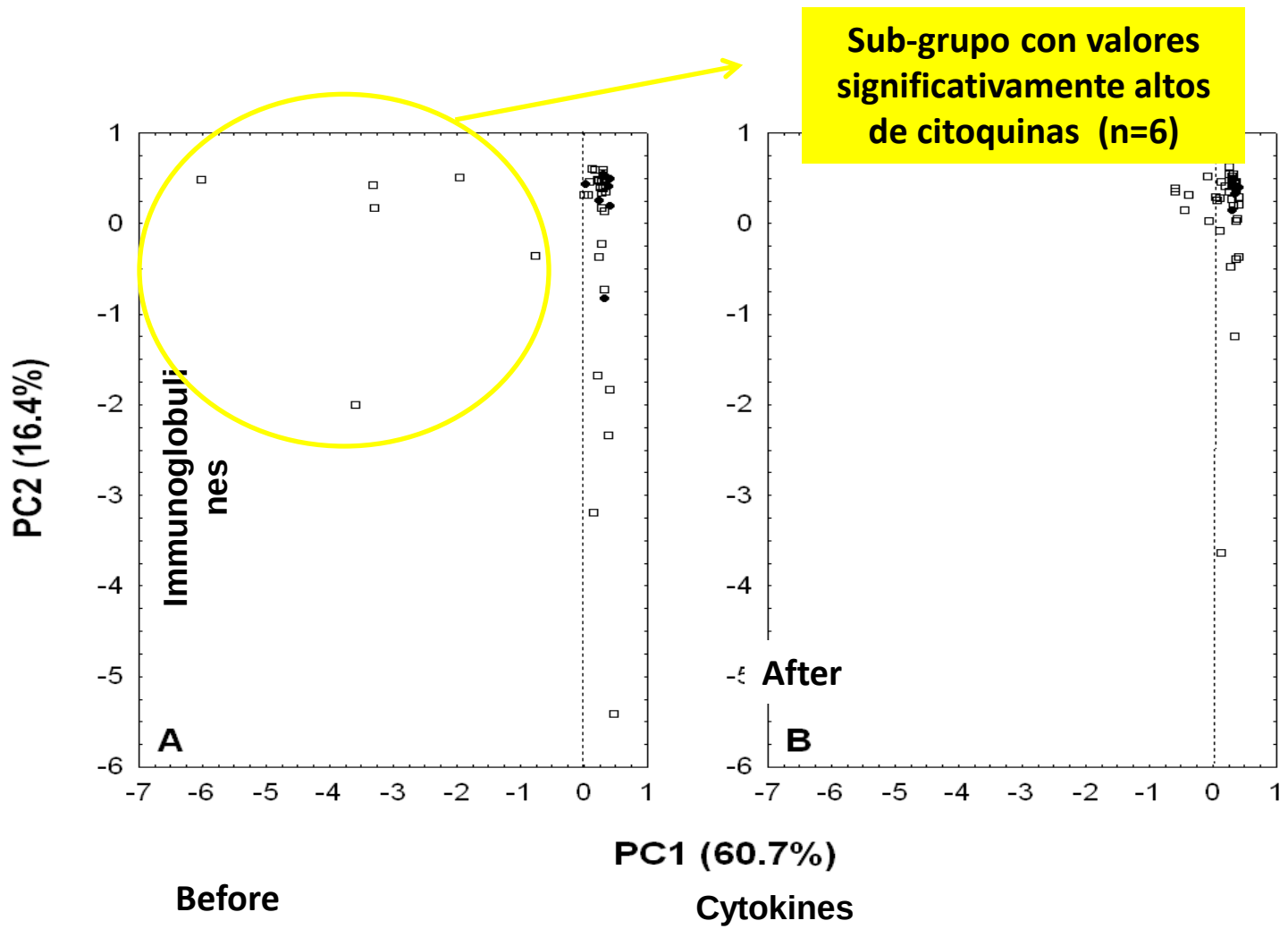
n=24

18 citokinas

6 inmunoglobulinas



Análisis de Componentes Principales (PCA) (antes del consumo de vino)



Cambios en la concentración de marcadores inmunes en las heces tras la ingesta de vino (n=6)

Subgrupo con niveles
iniciales altos de
citoquinas

Immunoglobulins	before	after
Ig G1 (µg/g feces)	1.09 (0.51;9.16)	2.55 (0.64;5.60)
Ig G2 (µg/g feces)	91.71 (27.96;206.5)	111.09 (31.13;175.79)
Ig G3 (µg/g feces)	0.98 (0.29;3.39)	1.65 (0.51;2.99)
Ig G4 (µg/g feces)	0.10 (0.00;0.77)	0.18 (0.06;0.59)
Ig M (mg/g feces)	0.05 (0.03;0.14)	0.06 (0.02;0.13)
Ig A (mg/g feces)	19.33 (13.79;24.93)	21.13 (12.52;27.43)

Cytokines (ng/g feces)	before	after
IL-1 _β	0.13 (0.12;0.22)	0.17 (0.09;0.36)
IL-2	60.95 (46.55;75.54)	1.38* (0.14;2.72)
IL-4	10.51 (8.10;10.95)	0.31* (0.07;0.54)
IL-5	9.80 (6.50;13.73)	0.43* (0.03;0.76)
IL-6	115.07 (78.38;142.80)	1.97* (0.25;3.44)
IL-7	0.01 (0.01;0.07)	0.01 (0.01;0.01)
IL-8	1.06 (0.62;1.31)	0.05* (0.00;0.12)
IL-10	39.46 (27.63;62.59)	0.54* (0.17;1.08)
IL-12(p70)	556.47 (441.56;682.70)	9.86* (0.80;17.71)

Cytokines (ng/g feces)	before	after
IL-13	0.20 (0.16;0.34)	0.02* (0.01;0.03)
IL-17	319.25 (270.75;417.16)	11.97* (1.45;25.23)
IFN-γ	3624.31 (2302.64;3952.46)	120.90* (15.99;272.89)
GRO-α	3.00 (2.60;3.31)	1.21* (0.88;1.65)
MCP-1	27.23 (23.54;34.02)	1.29* (0.29;1.94)
MIP-1 _β	1.19 (0.76;1.87)	0.47* (0.12;0.65)
TNF-α	732.48 (561.02;904.56)	8.16* (0.81;20.28)
G-CSF	188.33 (123.79;209.41)	11.87* (2.16;17.76)
GM-CSF	180.79 (148.67;259.47)	17.18* (11.57;21.68)

Reducción significativa por el contenido de 16
marcadores (citoquinas pro-inflamatorias): IL-2, IL-4,
IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70),IL-13, IL-17,IFN- γ,
GRO-α, MCP-1, MIP-1_β,TNF-α, G-CSF, and GM-CSF

CONCLUSIONES

- ✓ El consumo moderado y regular de vino promueve el metabolismo colónico de los polifenoles y de otros nutrientes, modificando el perfil metabólico fecal
- ✓ A pesar de la gran variabilidad interindividual encontrada, se pudo clasificar a los voluntarios en función de su capacidad para metabolizar los polifenoles del vino: metabolizadores altos, moderados y bajos
- ✓ La composición de la microbiota fecal fue diferente en el grupo de metabolizadores altos de polifenoles, sugiriendo que la capacidad de los seres humanos para metabolizar los polifenoles del vino podría estar relacionada con la composición de la microbiota colonica
- ✓ El consumo moderado de vino podría modular la respuesta inflamatoria intestinal *in vivo*, induciendo un efecto antiinflamatorio en huéspedes con inflamación intestinal asintomática

y Perspectivas....

- ✓ Argumentos científicos: soporte promociones 'Wine in moderation', conocimiento científico (línea estratégica de investigación)
- ✓ Comunicación eficaz: consumo moderado de vino y salud digestiva
- ✓ Diversificación, productos más orientados a las demandas del consumidor: extractos, subproductos (en todas las etapas de producción), derivados con base VINO

¡¡Muchas gracias!!



“El vino alegra el ojo, limpia el diente y sana el vientre”

Refranero popular



BODEGA MATARROMERA

TORRES



AGL2012-40172-C02-01

INNPACTO IPT 2012-0130-060000

