

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL A LO LARGO DEL TRACTO DIGESTIVO EN CERDOS IBÉRICOS

Crespo-Piazuelo^{1,2}, D., Estellé³, J., Revilla^{1,2}, M., Criado-Mesas¹, L., Ramayo-Caldas³, Y., Óvilo⁴, C., Fernández⁴, A.I., Ballester⁵, M. y Folch^{1,2}, J.M.

¹Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG), Consorcio CSIC-IRTA-UAB-UB, Bellaterra, España. ²Dpto. de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, UAB, Bellaterra, España. ³Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI), INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, Francia. ⁴Dpto. de Mejora Genética Animal, INIA, Madrid, España. ⁵Genética i Millora Animal, IRTA, Caldes de Montbui, España. daniel.crespo@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

El cerdo ibérico es un animal rústico con una conformación productiva menor que la de las razas de producción intensiva, y su mayor contenido de grasa intramuscular y espesor de la grasa dorsal lo hacen ideal para la producción de jamón (Serra et al., 1998).

Recientemente, la composición de la microbiota porcina y su estructuración en enterotipos se ha relacionado con la ganancia media diaria y el peso vivo en animales de 60 días de edad (Ramayo-Caldas et al., 2016). Además, Bäckhed et al. (2004) determinó que el metabolismo lipídico del cerdo se podría modificar mediante la regulación de la expresión génica por parte de la microbiota intestinal.

Para analizar la composición microbiana porcina se han seguido dos metodologías: amplificar y secuenciar las zonas variables del gen del ARN ribosomal 16S (Dowd et al., 2008) o mediante la secuenciación *shotgun* de las comunidades enteras (Xiao et al., 2016).

El objetivo del presente trabajo es describir las diferencias en la composición del microbioma a lo largo del tracto intestinal porcino en animales de raza ibérica, y evaluar su relación potencial con el metabolismo energético.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: Trece machos castrados ibéricos de la línea Torbiscal, alimentados *ad libitum* con un pienso comercial de 3.320 kcal de Energía Metabolizable y 15,6% de Proteína Bruta, fueron sacrificados a la edad de 4 meses con 48,7 kg de peso medio. A continuación, se diseccionaron para extraer el contenido intestinal de 5 tramos digestivos: duodeno, yeyuno, íleon, colon proximal y colon distal. Inmediatamente después de su obtención, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C.

Extracción de ADN y secuenciación del amplicón: Se pesaron ~0,2 g de cada una de las 65 muestras (13 animales x 5 tramos) y se utilizó el kit *PowerFecal*[®] (*MoBio*[®]) siguiendo sus indicaciones. A partir de este ADN, se secuenció la región V3-V4 del gen del ARN ribosomal 16S en un instrumento *MiSeq*[®] (*Illumina*[®]) con el *MiSeq*[®] *Reagent Kit v2* y de acuerdo al protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* de *Illumina*[®]. Se obtuvieron una media de más de 120.000 secuencias para cada una de las 65 muestras.

Composición de la microbiota intestinal: Mediante la plataforma libre *QIIME* (Caporaso et al., 2010) se procesaron las secuencias obtenidas uniendo los fragmentos homólogos en *forward* y *reverse*. Después, siguiendo las recomendaciones de Bokulich et al. (2013) y Rideout et al. (2014), se prepararon las librerías y se agruparon los OTUs (*Operational Taxonomic Units*). Para identificar y eliminar las quimeras, se utilizó *QIIME* con el método *BLAST* (Altschul et al., 1990).

Diversidad y diferencias en la abundancia de la microbiota intestinal: El cálculo de la diversidad alfa y beta, así como el gráfico NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) fue realizado en R (www.r-project.org) por medio del paquete *vegan* (Oksanen et al., 2016). Los análisis de abundancia diferencial y de presencia-ausencia se realizaron con el paquete *metagenomeSeq* (Paulson et al., 2013) mediante un modelo que incluía al animal como co-factor y usando como corte un $FDR \leq 0,01$.

Predicción de los metagenomas y diferencias funcionales entre tramos: La predicción de los metagenomas de las 65 muestras y su agrupación en KOs (*KEGG Orthologies*) a partir de la abundancia de sus OTUs se llevó a cabo con *PICRUSt* (Langille et al., 2013). El paquete *DESeq2* (Love et al., 2014) de R estimó la diferencia de abundancias entre los KOs siguiendo el mismo modelo aplicado con *metagenomeSeq*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se hallaron en total 1.669 OTUs en el contenido intestinal de los 5 tramos, de los cuales 643 fueron nuevos respecto a la base de datos de *GreenGenes* 13.8 (DeSantis et al., 2006). Todos los OTUs se agruparon en 179 géneros, siendo los más abundantes *Prevotella* (20,77%) y *Lactobacillus* (15,44%). Mirando su distribución por tramos (Figura 1), en duodeno y yeyuno, los géneros más dominantes fueron *Lactobacillus* y *Clostridium*, y en íleon, *Streptococcus*, seguido por varios géneros de la familia Clostridiaceae. Sin embargo, en el intestino grueso (colon proximal y distal), *Prevotella* era el género mayoritario. Además, el NMDS agrupaba perfectamente todas las muestras dependiendo del origen del contenido intestinal, reforzando la idea de que las composiciones son específicas de cada tramo y evidenciando una clara separación entre el intestino delgado y el grueso (Figura 2a).

Para estimar la riqueza y uniformidad de los OTUs presentes, calculamos la diversidad alfa (dentro de la muestra) y beta (entre las muestras) (Figura 2b y 2c). De acuerdo con lo descrito por Yang et al. (2016), se observa que al ir descendiendo por el tracto intestinal, la diversidad alfa aumenta mientras que la beta disminuye, lo que indicaría una menor riqueza de especies en el intestino delgado que en el intestino grueso, posiblemente debido a una menor cantidad de bacterias en el intestino delgado. En el colon hay mucha más diversidad de especies, pero también se da una mayor uniformidad entre las muestras. Esta uniformidad también se ve reflejada en el NMDS (Figura 2a), por la menor dispersión de los puntos correspondientes al intestino grueso.

La presencia-ausencia y la abundancia diferencial de OTUs confirmaron las marcadas diferencias entre los tramos digestivos. De los 1.669 OTUs encontrados, 325 no estaban presentes en el intestino grueso, mientras que 946 estaban ausentes del intestino delgado. De los restantes 398 OTUs, 86 fueron diferencialmente abundantes (p -ajustado $\leq 0,01$), siendo 77 más abundantes en intestino delgado (entre otros varios *Lactobacillus* spp. y *Clostridium* spp.), y 9 OTUs más abundantes en colon, 3 de ellos pertenecientes al género *Prevotella*, lo que concuerda con la gráfica por géneros de la Figura 1.

Las predicciones funcionales de los KOs elaboradas por *PICRUSt* se ajustaron a los OTUs de los tramos intestinales que se han descrito en los párrafos anteriores, observándose que en el intestino delgado hay una mayor abundancia de genes que codifican para enzimas microbianas relacionadas con el metabolismo del almidón, la síntesis de carotenos y aminoácidos, y fijación del carbono por medio del sistema fosfotransferasa. Estos resultados son coherentes con la rápida internalización de los carbohidratos simples para favorecer la proliferación y mantenimiento microbiano en este tramo (Zoetendal et al., 2012). En el colon, con menos oxígeno disponible, hay una predominancia de genes ligados al metabolismo energético mediante el ciclo del citrato y una fijación del carbono por el ciclo del dicarboxilato/4-hidroxiacetato característico de las bacterias anaerobias como *Prevotella* spp., la cual puede degradar mejor la fibra vegetal de los cereales presentes en la dieta (Liu et al., 2012), produciendo ácidos grasos de cadena corta para que sean aprovechados por el hospedador (Mach et al., 2015).

En conclusión, los hallazgos de este estudio confirman que las rutas energéticas del microbioma intestinal son distintas a lo largo de su recorrido. Para poder tratar de esclarecer la relación entre la predominancia de *Prevotella* spp., la dieta, los ácidos grasos de cadena corta, y la proporción Bacteroidetes/Firmicutes que provocan obesidad en los humanos (Ley et al., 2006) será interesante ampliar el número de muestras, y asociar la composición microbiana y los enterotipos con datos de metabolismo lipídico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F. 1990. *J. Mol. Biol.* 215: 403-10.
- Bäckhed, F. 2004. *PNAS.* 101: 15718-23.
- Bokulich, N.A. 2013. *Nat. Methods.* 10: 57-9.
- Caporaso, J.G. 2010. *Nat. Methods.* 7: 335-6.
- DeSantis, T.Z. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5069-5072.
- Dowd, S.E. 2008. *Foodborne Pathog. Dis.* 5: 459-472.
- Langille, M. 2013. *Nat. Biotechnol.* 31: 814-21.
- Ley, R. 2006. *Nature.* 444: 1022-3.
- Liu, H. 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 4102-4109.
- Love, M.I. 2014. *Genome Biol.* 15: 550.
- Mach, N. 2015. *Environ. Microbiol. Rep.* 7: 554-569.
- Oksanen, J. 2016. *Vegan.*
- Paulson, J.N. 2013. *Nat. Methods.* 10: 1200-2.
- Ramayo-Caldas, Y. 2016. *ISME J.* 10: 2973-2977.
- Rideout, J. R. 2014. *Peer J.* 2: e545.
- Serra, X. 1998. *Livest. Prod. Sci.* 56: 215-223.
- Xiao, L. 2016. *Nat. Microbiol.* 1: 16161.
- Yang, H. 2016. *Sci. Rep.* 6: 27427.
- Zoetendal, E. G. 2012. *ISME J.* 6: 1415-26.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2014-56369-C2 (Ministerio de Economía y Competitividad). D. Crespo-Piazuelo ha sido financiado con una beca de Formació i Contractació de Personal Investigador Novell (FI-DGR) de la Generalitat de Catalunya (ECO/1788/2014) y por una COST action de la *PiGutNet* (www.pigutnet.eu) para una estancia *Short Train Scientific Mission* en el grupo GABI (INRA, Francia) bajo la tutela de Jordi Estellé. M. Revilla ha sido financiado también con una beca FI-DGR (ECO/1639/2013). L. Criado ha sido financiada con una beca FPI asociada al proyecto AGL2014-56369-C2. Las muestras se obtuvieron en el Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL en Hontalbilla (Segovia) facilitadas por el proyecto MEDGAN-CM S2013/ABI-2913.

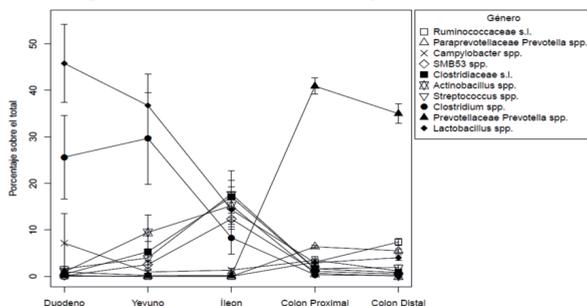


Figura 1. Evolución del porcentaje sobre el total de cada tramo a lo largo del intestino de los 10 géneros más abundantes. Los segmentos verticales indican el error estándar.

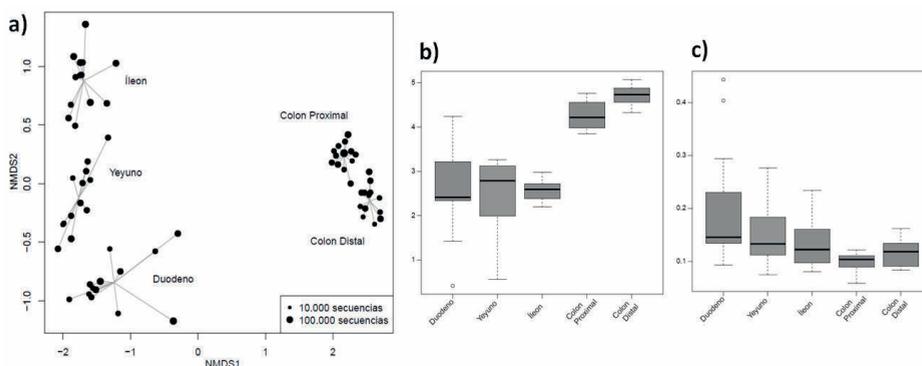


Figura 2. a) NMDS sobre las distancias de Bray-Curtis para las muestras de los 5 tramos. Los puntos indican la cantidad de secuencias. b) y c) Diagramas de cajas sobre el cálculo de las diversidades en los 5 tramos intestinales para los 13 animales: b) Diversidad alfa de Shannon. c) Diversidad beta de Whittaker mediante distancias de Bray-Curtis.

CHARACTERIZATION OF THE GUT MICROBIOME ALONG THE DIGESTIVE TRACT OF IBERIAN PIGS

ABSTRACT: The aim of this study was to describe the differences in the microbiome found along the Iberian pig gut. The DNA of five gut sections (duodenum, jejunum, ileum and proximal and distal colon) was extracted and the region V3-V4 of the 16S rRNA gene was sequenced. With *QIIME*, 1669 operational taxonomic units (OTUs) were found in total, distributed in 179 genera. *Lactobacillus* and *Clostridium* spp. were the two most abundant in the small intestine; however *Prevotella* spp. had the predominance in colon. The alpha diversity increases while the beta decreases whilst going down through the gut. The *PICRUSt* metagenome prediction showed that the phosphotransferase system is one of the most relevant pathways in the small intestine and the dicarboxylate/4-hydroxybutyrate in the large intestine due to the abundance of the previous genera.

Keywords: iberian pig, gut microbiome, 16S, metagenome prediction