

CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL TRAS UN PERIODO DE REPLECIÓN CON DIFERENTES SUPLEMENTOS DE HIERRO EN LECHONES DESTETADOS

A.M. Caballero Valcárcel¹; S. Martínez Miró²; J. Madrid Sánchez²; C. A. González-Bermúdez¹, T. Sánchez Moya¹; M. Santaella Pascual¹; C. Martínez Graciá¹

¹Departamento de Tecnología de los alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Campus Espinardo 30100.

²Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Campus Espinardo 30100.

1. Introducción

La anemia por deficiencia de hierro (Fe) es un problema de salud a nivel mundial, siendo más prevalente en lugares de escasos recursos como África y Asia Suroriental. Las tasas más altas de prevalencia se hallan en niños en edad preescolar (47,4%), y el número más elevado de personas afectadas son mujeres no embarazadas (468 millones) y embarazadas (56 millones) [1]. La prevalencia de la anemia por la deficiencia en hierro puede ser reducida fortificando alimentos con este elemento traza. No obstante solamente entre el 5-15% de hierro es absorbido y el resto pasa al colon donde queda disponible para la microbiota intestinal. Este aspecto no suele ser tenido en cuenta a la hora de fortificar los alimentos con hierro, siendo un elemento traza esencial para la mayoría de las bacterias patógenas [2].

Enfoques moleculares basados en el análisis de rADN 16S han mostrado que la microbiota intestinal está principalmente compuesta de los phyllos *Bacteroidetes* (*Bacteroides* spp.), Firmicutes (*Clostridium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, o *Lactobacillus* spp.), *Actinobacteria* (bifidobacterias), y *Proteobacteria* (enterobacterias), [3-5]. El hierro es un elemento traza esencial para la mayoría de los microorganismos intestinales, y algunas de estas bacterias poseen sistemas activos de transportadores de Fe, además de otros mecanismos para asimilar este mineral. *Bacteroides* spp. son altamente dependientes del hierro y una gran parte de la familia Enterobacteriaceae han desarrollado mecanismos, incluyendo sideróforos, para adquirir el hierro en competición con otras bacterias y el hospedador [6]. Solamente algunas bacterias, incluyendo *Lactobacillus*, no requieren Fe. *Lactobacillus* es un grupo mayoritario en la microbiota intestinal que tiene efectos beneficiosos en la salud intestinal [7]. En 2010 Zimmermann et al. realizaron un estudio monitorizado, analizando el efecto de 6 meses de fortificación con hierro electrolítico en la microbiota intestinal de niños africanos. La fortificación modificó la composición de la microbiota fecal, incrementando el número de *Enterobacteriaceae*, y disminuyendo el número de *Lactobacillus*, [8].

El objetivo de este trabajo fue analizar los cambios de la microbiota intestinal tras un periodo de repleción (21 días) con tres sales de hierro (pirofosfato férrico micronizado y encapsulado: PFME; fumarato ferroso: FF; hierro electrolítico: HE) en relación al sulfato ferroso heptahidratado: SFH utilizado como fortificante estándar, en lechones destetados anémicos. El modelo animal fue elegido por su similitud fisiológica con el humano, y poder así extraer conclusiones aplicables a la fortificación de papillas infantiles.

2. Materiales y métodos

Lechones y dietas. Se utilizaron para este ensayo 36 lechones machos recién destetados con 21 días de edad, raza Landrace, de aprox. 6,5 Kg de p.v. Se le administró al tercer día de vida una dosis de 30 mg de Fe- dextrano vía intramuscular (por debajo de las recomendaciones, pero suficiente para garantizar su crecimiento durante la lactancia)[9], excepto al grupo control positivo, cuya dosis de hierro administrado al nacer fue la estándar (180 mg). La prueba comenzó el día 1 postdestete y se desarrolló en dos fases; a) primera fase: 7 días de adaptación, alimentándolos con pienso base deficitario en este mineral. Se constató el estado anémico (Hgb < 8 g/dl) al final de esta fase. Obviamente el grupo control positivo se alimentó con pienso enriquecido con hierro obteniendo niveles de hierro en sangre normales (Hgb > 10 g/dl). b) segunda fase de 28 días de duración. Se asignaron los lechones, de forma aleatoria, a 5 tratamientos, las dietas tratamiento han consistido en: 1: dieta con fumarato ferroso (dieta basal + 120mg/kg de Fe como fumarato ferroso); 2: dieta con hierro electrolítico (dieta basal + 120mg/kg de Fe como hierro electrolítico); 3: dieta con pirofosfato férrico micronizado encapsulado (dieta basal + 120mg/kg de Fe como pirofosfato férrico micronizado encapsulado); 4: dieta con sulfato ferroso heptahidrato (dieta basal + 120 mg/kg de Fe como sulfato ferroso heptahidrato).; 5: dieta control negativo (dieta basal deficitaria en Fe); el sexto grupo estuvo constituido por los controles positivos (lechones no anémicos alimentados con pienso base y sulfato ferroso). Durante el ensayo tuvieron libre acceso al agua y al pienso. Se tomaron muestras de heces al inicio del ensayo (Día 0), antes de aleatorizar a los lechones, y al final del ensayo (Día 28), tal y como se muestra en la figura 1.

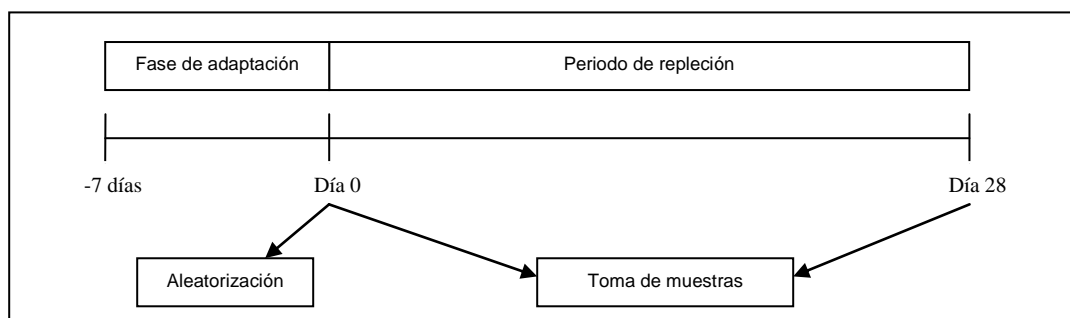


Figura1. Esquema general del estudio

Extracción ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa. El ADN bacteriano se extrajo de las heces de los lechones mediante el uso del kit *AIAamp DNA stool mini* (Quiagen, Hilden, Alemania). Para medir los niveles de expresión de rDNA 16S de bacterias se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) cuantitativa en tiempo real. Se utilizaron placas de 96 pocillos y el sistema C1000 Termociclador CFX96 en tiempo real (Bio-rad inc., Hercules, California, EE.UU.).

Grupos bacterianos. Los grupos bacterianos estudiados fueron: *Bifidobacteriaspp.*, *Lactobacilluspp.*, *Bacteroidesspp.*, *Atopobium spp.*, *Clostridiumleptum*, *Clostridiumcoccoides*, *Enterobacteriaspp.*, *Enterococcusspp.*, y Bacterias totales.

3. Resultados y Discusión

Después del periodo de repleción todos los grupos bacterianos aumentaron en los 5 tratamientos asignados, así como en el control positivo (tabla 1). Para el grupo de bacterias *Atopobium spp* y *Bacteroides spp.*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los 6 grupos analizados ($P < 0.05$), estos grupos bacterianos dependen del hierro que no es absorbido en intestino delgado y pasa a disposición de la flora microbiana que habita en el intestino grueso [6]. Para el grupo *Bifidobacteriaspp.* se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en los lechones alimentados con hierro electrolítico (HE), este grupo de bacterias se engloba dentro de las bacterias beneficiosas para el hospedador. El HE es un fortificante que contiene hierro elemental, lo que hace que sea menos soluble en el agua y por tanto menos biodisponible [2]. Otro grupo beneficioso para la salud intestinal del hospedador son los lactobacilos; se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el grupo suplementado con fumarato ferroso, hierro electrolítico, sulfato ferroso y en el grupo control negativo, sin embargo este grupo no requiere hierro para su metabolismo. No obstante en otros estudios se ha comprobado un efecto negativo tras la fortificación con hierro, disminuyendo la concentración de lactobacilos y produciéndose un incremento de otras bacterias patógenas [8]. En el grupo de los *Enterococcus spp.* y bacterias totales no se obtuvieron diferencias significativas para ningún grupo estudiado ($P > 0.05$).

Respecto a los clostridium, en *Clostridium coccoides* se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para el grupo de fumarato, hierro electrolítico, sulfato ferroso y para el control positivo; y en el caso de *Clostridium leptum* sólo para fumarato ferroso, control negativo y control positivo.

La población de enterobacterias aumentó significativamente en los mismos tratamientos que los referidos para *Clostridium leptum*. Autores como Zimmerman describen un aumento de las enterobacterias tras un periodo de repleción, sobre todo en bacterias patógenas como *Salmonella spp.*, En este estudio, el grupo control positivo no tuvo una fase de repleción al no ser lechones anémicos al comienzo del estudio, por lo que el aumento de la concentración de enterobacterias en este grupo pudo ser debido a otros factores no estudiados.

Tabla 1. Poblaciones bacterianas analizadas el día inicial y final del estudio, por cada grupo de tratamiento asignado. Los resultados se expresan en logaritmo de copias de rADN 16S por g heces de lechón¹

Poblaciones bacterianas	Tratamientos					
	FF	HE	PFME	SFH	Control negativo	Control positivo
<i>Atopobium</i> spp						
D0	5,24±0,72	5,85±0,69	6,02±0,63	5,88±0,50	5,03±0,84	6,05±0,84
D28	6,56±0,85*	6,73±0,84*	6,68±0,66*	6,99±0,73*	6,45±0,58*	6,47±0,56*
<i>Bifidobacteria</i>						
D0	6,17±0,53	5,96±0,50	6,36±0,51	6,33±0,49	6,16±0,59	6,26±0,62
D28	6,29±0,41	6,30±0,40*	6,51±0,45	6,51±0,44	6,21±0,56	6,46±0,43
<i>Lactobacillus</i> spp						
D0						
D28	5,10±0,95	4,53±0,73	4,86±0,8	4,37±1,23	4,14±1,14	5,27±1,00
	5,65±0,73*	5,33±0,44*	5,25±0,68	5,82±0,40*	5,38±0,66*	5,55±0,61
<i>Enterococcus</i> spp.						
D0						
D28	4,77±0,76	4,86±1,08	4,91±0,58	4,77±0,72	4,76±0,80	5,09±0,51
	4,90±0,79	5,34±0,71	5,29±0,88	4,88±0,62	5,02±0,85	5,19±0,66
<i>Bacteroides</i> spp.						
D0						
D28	12,33±0,49	12,28±0,64	12,61±0,87	12,33±1,33	12,29±0,70	12,71±0,89
	12,93±0,59	12,99±0,46	13,30±0,34	13,49±0,57	13,28±0,46*	13,25±0,38
	*	*	*	*		*
<i>Clostridium</i> coccoide s						
D0	7,45±0,83	7,25±0,90	7,89±0,61	7,68±0,62	7,31±1,35	7,64±0,95
D28	8,07±0,67*	7,80±0,59*	7,97±0,62	8,48±0,56*	7,89±0,74	8,40±0,70*
<i>Clostridium</i> leptum						
D0						
D28	9,01±0,91	9,33±1,06	9,57±0,51	9,24±0,57	9,09±0,60	9,52±0,77
	9,85±0,83*	9,87±0,72	9,80±0,74	10,18±0,61	9,53±0,76*	10,16±0,60
				*		*
<i>Enterobacteria</i> spp.						
D0						
D28	8,91±0,59	9,59±0,67	9,52±0,94	9,20±0,59	9,03±0,81	9,26±0,74
	9,56±1,03*	9,59±1,12	9,51±0,94	9,51±0,83	9,58±0,82*	10,46±1,33
						*
Bacterias totales						
D0						
D28	13,54±0,57	13,65±0,60	13,88±0,53	13,66±0,49	13,57±0,47	13,80±0,71
	13,77±0,51	13,88±0,50	13,91±0,38	14,17±0,48	13,82±0,0,4	14,07±0,43

6

¹ Valores expresados como Media ± desviación estándar; n= 6 por tratamiento.² D0 corresponde al inicio del estudio y D28 corresponde al día final del estudio. FF= fumarato ferroso, HE= hierro electrolítico, PFME= pirofosfato férrico micronizado y encapsulado, SFH= sulfato ferroso heptahidratado.

*Diferencias significativas entre los dos días de muestreo (P<0.05) dentro del mismo tratamiento.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que después de la administración de hierro mediante fortificantes añadidos a la misma dieta basal durante 28 días, la flora intestinal se modifica en relación al tipo de fortificante usado, no obstante esta tendencia también se produce en los lechones no anémicos (control positivo). El fortificante en el que no se encuentra un incremento significativo en siete de las nueve poblaciones bacterianas estudiadas, es el pirofosfato férrico micronizado y encapsulado, esto puede ser debido a su alta biodisponibilidad, comprobada previamente por nuestro grupo de investigación. Este hecho daría lugar a que la absorción del hierro en el intestino delgado fuera superior al del resto de fortificantes, lo que supondría que acceda menos hierro al intestino grueso para ser utilizado por los grupos de bacterias estudiadas. También podemos concluir que los incrementos en las poblaciones bacterianas tras el periodo de repleción, son menores en todos los lechones anémicos (independientemente del tratamiento) con respecto los lechones no anémicos, especialmente en las enterobacterias y los microorganismos del género *Clostridium*. Como es sabido, la anemia produce un incremento en la absorción del hierro y por lo tanto una menor accesibilidad de este mineral para las bacterias dependientes de hierro que se encuentran en intestino grueso.

5. Bibliografía

- [1] García-Casal, M.N y Landaeta-Jiménez, M. 2012. Salud Reproduct. OMS; www.who.int/es
- [2] Dostal A, et al. J Nutr. 2011; 142: 271-7.
- [3] Eckburg PB et al. Science. 2005; 308:1635-8
- [4] Flint HJ, et al. Environ Microbiol. 2007; 9:1101-11
- [5] Wu GD, et al. BCN Microbiol. 2010; 10:206
- [6] Andrews SC, et al. FEMS Microbiol Rev. 2003; 27:215-37
- [7] Imbert M, et al. CurrMicrobiol. 1985; 4:273-8.
- [8] Zimmermann MB, et al. Am J ClinNutr. 2010; 92:1406-15
- [9] Stahl CH, et al. J. Anim. Sci. 1999; 77: 2135-42.