



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA
INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA
REFINADO FRENTE AL VIRGEN SOBRE LA
MICROBIOTA INTESTINAL EN UN
MODELO MURINO**

**PRESENTADA POR:
NIEVES MARTÍNEZ DE LA CASA**

**DIRIGIDA POR:
DR. D^a. MAGDALENA MARTÍNEZ CAÑAMERO
DR. D. ANTONIO COBO MOLINOS
DR. D^a. ISABEL PRIETO GÓMEZ**

JAÉN, XX DE ENERO DE 2020

ISBN XXX-XX-XXXX-XXX-X

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA REFINADO FRENTE AL VIRGEN SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO

Memoria para optar al grado de Doctora
Jaén, enero de 2020

Fdo.: Nieves Martínez de la Casa
Aspirante al grado de Doctora

Los Directores del trabajo:

Fdo.: Magdalena Martínez Cañamero

Fdo.: Antonio Cobo Molinos

Fdo.: Isabel Prieto Gómez

Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud.
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

Los directores de tesis **D^a. Magdalena Martínez Cañamero, D. Antonio Cobo Molinos y D^a. Isabel Prieto Gómez**, pertenecientes al Área de Microbiología y de Fisiología Animal del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

HACEN CONSTAR: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Estudio comparativo de la influencia del aceite de oliva refinado frente al virgen sobre la microbiota intestinal en un modelo murino”** presentado por **D^a. Nieves Martínez de la Casa**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctora.

Jaén, enero de 2020

Fdo.: Magdalena Martínez Cañamero

Fdo.: Antonio Cobo Molinos

Fdo.: Isabel Prieto Gómez

AGRADECIMIENTOS

En este apartado, me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han ayudado a hacer posible esta tesis.

En primer lugar, mi agradecimiento a mis directores de tesis, a la catedrática D^a. Magdalena Martínez Cañamero, que me ha permitido realizar mis estudios de doctorado en su grupo de investigación, así como a D. Antonio Cobo Molinos y D^a Isabel Prieto Gómez, ya que siempre han estado ahí para todas mis consultas, dudas y preguntas, y de los que he aprendido mucho.

Gracias también a los compañeros (profesores, doctorandos, graduandos...) que me han echado una mano cuando lo he necesitado, y a todos los técnicos y técnicas de laboratorio y del Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén, que facilitan y hacen posible que llevemos a cabo nuestra tarea.

Por último, gracias a mi hermano César y mi cuñada Laura, porque en los momentos buenos y en los no tan buenos, siempre han hecho que mi vida sea mucho mejor.

Esta tesis está dedicada a mi amiga Elena, cuya vocación y espíritu científico me han inspirado siempre y me empujaron a comenzar este estudio, y a mi madre, Nieves, sin la cual no habría llegado hasta aquí.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	Aceite de oliva	7
1.1.1.	Historia	7
2.1.1.	Composición química	13
2.2.	Dieta Mediterránea	17
2.3.	Microbiota intestinal y su relación con la dieta	20
2.4.	Microbiota intestinal y aceite de oliva	24
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
3.1.	Objetivos específicos.....	41
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
4.1.	Objetivos 1 y 2	45
4.1.1.	Animales	45
4.1.2.	Biodiversidad bacteriana	48
4.1.3.	Estudios estadísticos	49
4.2.	Objetivo 3	50
4.2.1.	Animales	50
4.2.2.	Biodiversidad bacteriana	50
4.2.3.	Análisis estadístico	50
4.2.4.	Aislamiento de cepas de bacterias lácticas procedentes de intestino grueso de ratones alimentados con una dieta alta en aceite de oliva virgen extra.	51
4.2.5.	Identificación preliminar de las cepas.....	51
4.2.6.	Pruebas bioquímicas	51
4.2.7.	Producción de bacteriocinas	52
4.2.8.	Presencia de genes para aminas biógenas.....	53
4.2.9.	Secuenciación de cepas.....	55

4.2.10.	Detección de posibles metanógenas en intestino grueso de ratón mediante microscopía confocal de fluorescencia. Comparación entre varias dietas altas en grasa.....	56
4.3.	Objetivo 4	56
4.3.1.	Cepas bacterianas.....	56
4.3.2.	Ensayo de tolerancia al aceite de oliva con ácido cólico.....	57
4.3.3.	Ensayo de tolerancia al aceite de oliva con lecitina	57
4.3.4.	Ensayo de tolerancia al aceite de oliva con papel de filtro	57
5.	RESULTADOS.....	59
5.1.	Objetivos 1 y 2.....	61
5.2.	Objetivo 3	83
5.3.	Objetivo 4	103
6.	DISCUSIÓN	109
7.	CONCLUSIONES	125
8.	REFERENCIAS	129

1. RESUMEN

En los últimos años se están llevando a cabo numerosos estudios de investigación científica que tratan de conocer la composición de nuestra microbiota intestinal, debido al interés creciente que produce la ya más que conocida relación entre esta microbiota y la salud de su hospedador. La alta biodiversidad microbiana de nuestro sistema gastrointestinal y la gran cantidad de interacciones que se producen entre estos microorganismos y su hospedador, están ampliamente influenciados por la dieta.

Se ha demostrado que el aceite de oliva virgen extra (AOVE) tiene una clara influencia en la microbiota intestinal en comparación con otras grasas, habiéndose estudiado ampliamente los beneficios fisiológicos que produce en su consumidor. Sin embargo, una gran proporción de la población consume aceite de oliva refinado (AOR), que se trata del aceite de oliva virgen después de un proceso depurativo que no solo suaviza su sabor, sino que también lo priva de polifenoles y otros componentes minoritarios.

En este estudio, hemos comparado la influencia en la microbiota intestinal de una dieta rica en este AOR con otras dietas enriquecidas en grasa. Con este objetivo, se alimentaron ratones Swiss Webster con una dieta estándar o rica en grasas enriquecidas con AOVE, AOR o mantequilla (M), respectivamente. También se evaluaron determinados parámetros fisiológicos. Al final de período de alimentación, se extrajo el ADN de las heces y el ARNr 16S fue pirosecuenciado. El grupo alimentado con AOR se comportó de manera diferente al grupo de AOVE en la mitad de aquellas familias que presentaban diferencias estadísticamente significativas entre las dietas, con niveles comparativos más altos en tres familias: *Desulfovibrionaceae*, *Spiroplasmataceae* y *Helicobacteraceae*, así como también en los niveles de colesterol total.

Estos resultados son nuevamente indicativos de un vínculo entre dietas específicas, ciertos parámetros fisiológicos y la prevalencia de algunos taxones, pero también respaldan la posibilidad de que los polifenoles y los componentes menores del AOVE estén implicados en algunos de los efectos propuestos de esta grasa a través de la modulación de la microbiota intestinal.

Otro aspecto abordado en este estudio, ha sido utilizar el modelo murino anterior para estudiar la evolución de grupos microbianos concretos y construir colecciones de cepas aisladas a partir de las heces de ratones, alimentados con

diferentes dietas altas en grasas y, la posterior identificación de dichas cepas. Este estudio se ha centrado en cepas de bacterias lácticas del intestino grueso, concretamente del género *Lactobacillus*, un grupo de gran importancia para la salud del hospedador.

Además de la interacción con estos grupos bacterianos, cada vez está adquiriendo más importancia la relación de las arqueas con el ser humano. Por este motivo, también hemos dedicado una parte de nuestro estudio a la detección mediante microscopía confocal de fluorescencia, de posibles arqueas metanógenas del intestino grueso de ratón.

Por último, hemos aislado una colección perteneciente al género *Enterococcus* de diversas muestras de alimentos y ambientales, a la que se le realizaron tres tipos de ensayos utilizando diferentes técnicas (ensayo con papel de filtro, ensayo con ácido cólico y ensayo con lecitina), para comparar su comportamiento frente al aceite de oliva, tanto virgen extra como refinado.

2. INTRODUCCIÓN

1.1. Aceite de oliva

1.1.1. Historia

El árbol del olivo (perteneciente a la familia *Oleaceae*, género *Olea*) y el aceite obtenido de su fruto, llevan siglos acompañando la historia de la humanidad. Aunque el origen del cultivo del olivo es incierto, existen numerosos utensilios relacionados con su aprovechamiento que datan este origen en las antiguas civilizaciones de Creta y Egipto. Es, sin embargo, la cultura griega la que impulsa definitivamente el consumo del aceite de oliva y le da mayor importancia, llegando a reflejarse esta importancia en numerosas citas literarias e incluso formando parte de la mitología: el árbol del olivo que ofrece Atenea al dios Zeus en la fundación de Atenas. Gracias a esta mayor producción de aceite griega y al extenso comercio que realizaban los fenicios por toda la cuenca mediterránea, se implantó el cultivo del olivo en la zona sur de la Península Ibérica, es decir, la actual Andalucía, hacia el siglo XI a.C.

A lo largo de la historia, los frutos del olivo se han utilizado como alimento, pero también se ha aprovechado su aceite para producir afrodisíacos, emolientes, laxantes, sedantes y tónicos, así como para el tratamiento de patologías específicas como los cólicos, alopecia, parálisis, enfermedades reumáticas e hipertensión arterial¹.

Actualmente, los países mediterráneos producen aproximadamente el 98% de la producción mundial de aceite de oliva. El país líder en la producción de aceite de oliva es España, seguido por Italia y Grecia, considerando las producciones medias en las campañas de 2008 a 2009 y de 2013 a 2014².

España se sitúa en el primer lugar mundial en la producción de aceite de oliva, y también en superficie, representando aproximadamente el 60% de la producción de la UE y el 45% de la mundial, superando la media anual el 1.300.000 de toneladas en las campañas del 2014 al 2019³.

¹Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev.* 2007; 12(4):331-342.

²Leone A, Romaniello R, Peri G, Tamborrino A. Development of a new model of olives destoner machine: Evaluation of electric consumption and kernel characterization. *Biomass and Bioenergy.* 2015; 81:108-116.

³Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019.

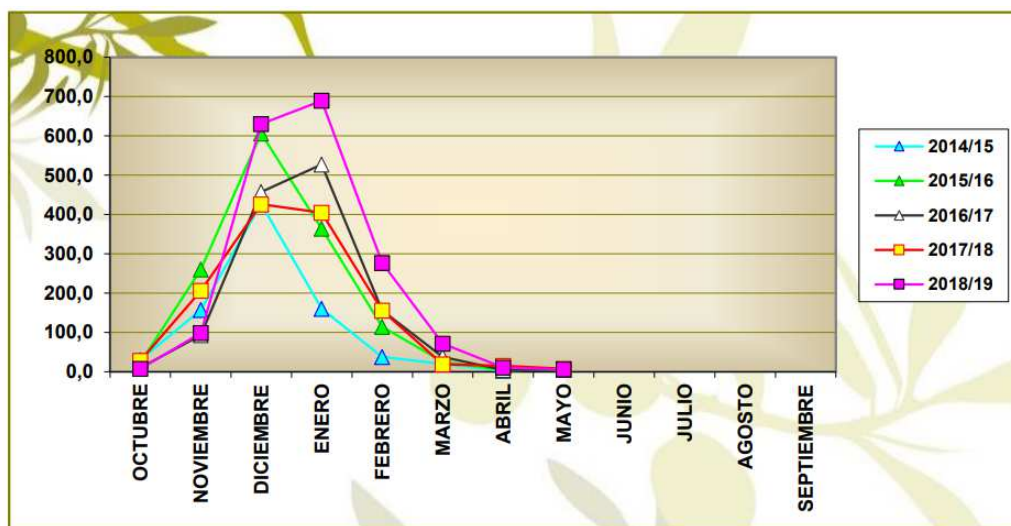


Figura 1: Evolución de la producción de aceite de oliva en España. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019.

A nivel nacional, es Andalucía la comunidad que produce un mayor volumen de aceite de oliva. La superficie de olivar andaluz para almazara ha aumentado en más de 93.000 hectáreas en la última década, superando actualmente los 1,5 millones de hectáreas, de las que la mayor parte se localiza en la provincia de Jaén (582.427 hectáreas). El número de almazaras activas para esta campaña asciende a 851, de las cuales 325 pertenecen a Jaén (38%). El olivar constituye el principal cultivo de Andalucía, con un valor de la producción de más de 2.800 millones de euros en la campaña 2017/2018. La producción media de aceituna destinada a aceite en las últimas cinco campañas se sitúa en torno a los 5,1 millones de toneladas⁴.

El proceso de extracción es la fase en la que se separa el aceite del resto de componentes de la aceituna (agua, hueso, piel, etc.). Este proceso consiste en varias fases: molienda, mezclado, prensado o centrifugación para el sistema clásico o el de centrifugación respectivamente, y la separación de la fase líquida (figura 2). Las técnicas de extracción se han desarrollado a lo largo de la historia, aumentando la mecanización para reducir la mano de obra y los costes⁵.

⁴Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 2019.

⁵Vekiari SA, Papadopoulou P, Koutsaftakis A. Comparison of different olive oil extraction systems and the effect of storage conditions on the quality of the virgin olive oil. *Grasas y Aceites*. 2002; 53(3):324-329.

Los sistemas más tradicionales de prensado están en desuso, y son pocas las almazaras que aún los conservan. Es el sistema de extracción por centrifugación el que actualmente más se utiliza a nivel industrial, ya que resulta más eficaz y menos costoso. Consiste en realizar una centrifugación diferencial de la pasta batida obtenida de las aceitunas, que dará lugar a una separación en capas de los distintos componentes debido a sus diferentes densidades.



Figura 2: Métodos de extracción del aceite de oliva. Fuente propia.

El aceite de oliva se puede producir y distribuir principalmente como cuatro productos diferentes (figura 3): aceite de oliva virgen extra (AOVE), que es un jugo de alta calidad que se extrae de las aceitunas solo por medios mecánicos sin intervención química; aceite de oliva virgen (AOV), que es un jugo de buena calidad que se extrae de las aceitunas solo por medios mecánicos sin intervención química; aceite de oliva refinado (AOR), que es un aceite de baja calidad que se somete a una intervención química para convertirse en comestible y aceite de oliva (AO), que es AOR con un bajo porcentaje (10-15%) de AOV para mejorar la palatabilidad. Por lo general, el AO es la única forma en que el AOR llega al consumidor, ya que las propiedades organolépticas del AOR son muy malas.

La extracción de estos tipos de aceite dará lugar al orujo de oliva, que es el residuo de la aceituna molida y prensada, y del que, a través de procedimientos químicos, se obtendrá el aceite de orujo de oliva.

La composición de ácidos grasos es similar en los cuatro tipos de productos, pero los componentes menores, principalmente compuestos fenólicos, se agotan en el AOR, ya que se pierden durante el procedimiento de extracción química⁶. Cabe señalar que se supone que los compuestos fenólicos son una de las fracciones más saludables del aceite de oliva^{7, 8, 9}.

⁶Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J. Nutr.* 1999; 129:2177–2183.

⁷Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol.* 2012; 23(2):129-135.

⁸Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38(8):647-659.

⁹Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Lista J, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(8):769-777.

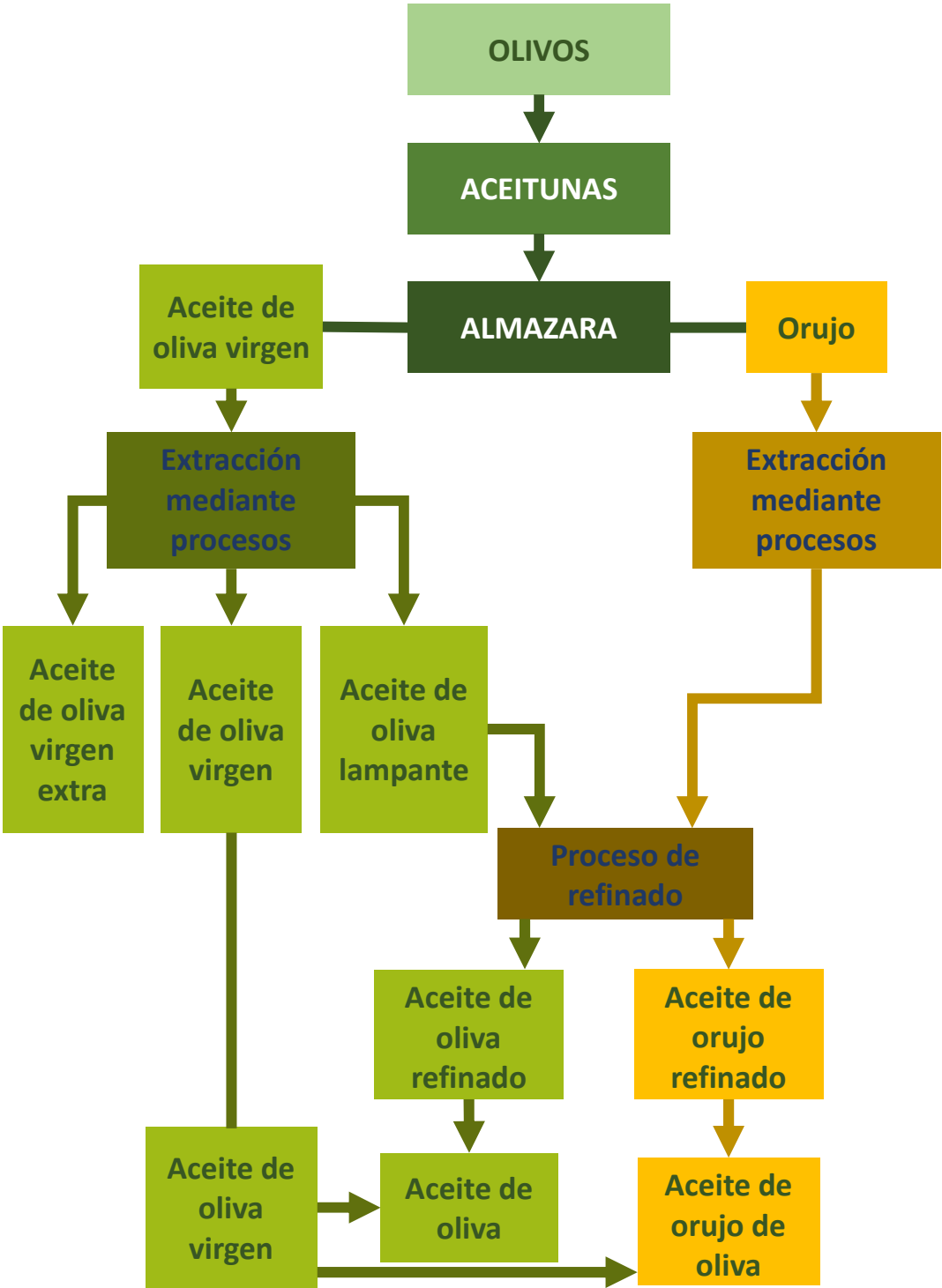


Figura 3: Producción de aceites aptos para el consumo. Fuente propia.

Aceite de oliva	Aceites de oliva vírgenes	Aceite de oliva virgen extra
Es el aceite obtenido solamente del fruto del olivo (<i>Olea europea</i> L.), excluyendo aceites obtenidos utilizando disolventes o procesos de reesterificación o con cualquier mezcla con aceites de otro tipo.	Son los aceites obtenidos del fruto del olivo solamente mediante procedimientos mecánicos o físicos bajo unas condiciones, particularmente las condiciones térmicas, que no llevan a alteraciones en el aceite, y que no se han sometido a otro tratamiento que no sea lavado, decantación, centrifugación y filtración.	Presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 0,8 gramos por 100 gramos, y las otras características de las que corresponden a aquellas fijadas para esta categoría en la norma.
		Aceite de oliva virgen Presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 2 gramos por 100 gramos, y las otras características de las que corresponden a aquellas fijadas para esta categoría en la norma.
	Aceite de oliva refinado Es el aceite de oliva obtenido a partir de aceites de oliva mediante métodos de refinación que no conllevan alteraciones en la estructura glicérica inicial. Presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 0,3 gramos por 100 gramos, y las otras características de las que corresponden a aquellas fijadas para esta categoría en la norma.	
	Aceite de oliva Es el aceite resultante de la mezcla de aceite de oliva refinado y aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo. Presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 1 gramo por 100 gramos, y las otras características de las que corresponden a aquellas fijadas para esta categoría en la norma.	
Aceite de orujo de oliva	Aceite de orujo de oliva refinado	
Es el aceite obtenido mediante el tratamiento del orujo de oliva con disolventes u otros tratamientos físicos, excluyendo aceites obtenidos utilizando disolventes o procesos de reesterificación o con cualquier mezcla con aceites de otro tipo.	Es el aceite obtenido a partir del aceite de orujo de oliva crudo mediante métodos de refinación que conllevan alteraciones en la estructura glicérica inicial. Presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 0,3 gramos por 100 gramos, y las otras características de las que corresponden a aquellas fijadas para esta categoría en la norma.	
	Aceite de orujo de oliva Es el aceite resultante de la mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo. Presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 1 gramo por 100 gramos, y las otras características de las que corresponden a aquellas fijadas para esta categoría en la norma.	

Tabla 1: Descripción y composición de los aceites de oliva aptos para el consumo (Adaptación de International Olive Council, T.15/NC No 3/Rev. 8. 2015 y Codex Alimentarius CL 1993/35-FO. CODEX STAN 33-1981).

2.1.1. Composición química

El aceite de oliva, al igual que otros aceites y grasas, se compone de un alto número de compuestos, que resulta en una matriz altamente compleja. Debido a que los componentes del aceite de oliva son tantos, el número de métodos analíticos empleado también es grande. Así, la composición química del aceite de oliva suele dividirse en dos grandes grupos: uno mayoritario, la fracción saponificable, que es la grasa en sí, y otro minoritario o fracción insaponificable, un pequeño porcentaje con respecto al total de la composición del aceite, que sin embargo aporta gran importancia con respecto a los componentes saludables (figura 4)¹⁰.

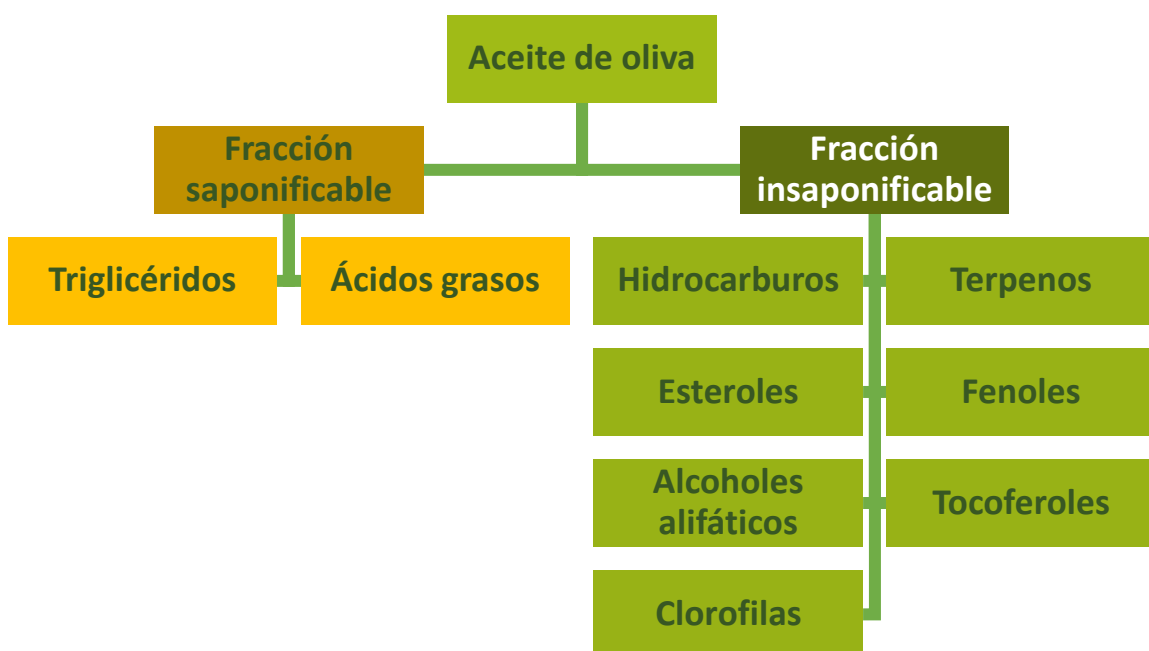


Figura 4: Clasificación química de los componentes del aceite de oliva. Adaptación de Harwood J, Aparicio R. *Handbook of olive oil, Analysis and Properties*. Kluwer Academic Publishers J.L. Harwood, R. Aparicio. 2000.

¹⁰Harwood J, Aparicio R. *Handbook of olive oil, Analysis and Properties*. Kluwer Academic Publishers J.L. Harwood, R. Aparicio. 2000.

La fracción saponificable está compuesta mayoritariamente por triglicéridos y una pequeña proporción de ácidos grasos libres. Los componentes principales (triacilgliceroles) representan alrededor del 98-99% del peso total del aceite, principalmente ácido oleico (ácido graso monoinsaturado) mucho más alto (55–83%) que el de otros ácidos grasos (linoleico, palmítico o esteárico), que oscilan entre el 3% y el 21%^{11, 12, 13, 14}.

La fracción insaponificable la componen una serie de sustancias muy diversas no glicéridas, denominadas componentes menores o secundarios del aceite de oliva. Los componentes menores están presentes en pequeñas cantidades (aproximadamente el 2% del peso del aceite) e incluyen más de 230 compuestos químicos como los hidrocarburos (escualeno), fitoesteros (β-sitosterol, estigmasterol y campesterol), tocoferos (α-tocoferol), carotenoides (β-caroteno), pigmentos colorantes (clorofilas), alcoholes alifáticos y triterpénicos, compuestos volátiles y compuestos fenólicos, como el tirosol (TYR) e hidroxitirosol (HT)^{15, 16, 17, 18}.

Son precisamente estos compuestos fenólicos, los que le aportan al aceite de oliva una gran parte de sus propiedades aromáticas y saludables.

¹¹Casas R, Estruch R, Sacanella E. The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-mediated Inflammatory Responses. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18(1):23-35.

¹²Bernardini E, Visioli F. High quality, good health: The case for olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2017; 119(1):Olive Oil 1500505.

¹³Covas MI, Fito M, De la Torre R. in *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. AOCS Press. 2015; 31–52.

¹⁴Deiana M, Serra G, Corona G. Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. *Food Funct*. 2018; 9(8):4085-4099.

¹⁵Casas R, Estruch R, Sacanella E. The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-mediated Inflammatory Responses. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18(1):23-35.

¹⁶Bernardini E, Visioli F. High quality, good health: The case for olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2017; 119(1):Olive Oil 1500505.

¹⁷Covas MI, Fito M, De la Torre R. in *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. AOCS Press. 2015; 31–52.

¹⁸Deiana M, Serra G, Corona G. Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. *Food Funct*. 2018; 9(8):4085-4099.

Compuestos fenólicos

Tradicionalmente, los efectos beneficiosos para la salud del aceite de oliva se han atribuido a su alto contenido en ácido oleico. Sin embargo, estudios científicos más recientes han demostrado que estos efectos también están causados por la fracción fenólica del aceite de oliva^{19, 20}.

Así, algunas propiedades farmacológicas del aceite de oliva, el fruto del olivo y sus hojas, se han reconocido como componentes importantes de la medicina y de una dieta saludable debido a su contenido fenólico²¹.

Los compuestos fenólicos del aceite de oliva son convencionalmente llamados polifenoles, aunque no todos son derivados del polihidroxilo.

En general, se pueden encontrar cuatro clases principales de compuestos fenólicos en el aceite de oliva: flavonoides, lignanos, fenoles simples y secoiridoides. Los niveles de los dos últimos grupos son más altos y muchos de estos compuestos fenólicos se encuentran exclusivamente en aceites de oliva^{22, 23}.

¹⁹Martín-Peláez S, Covas MI, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(5):760-771.

²⁰Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 2010; 78(2):133-154.

²¹Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 2010; 78(2):133-154.

²²Martín-Peláez S, Covas MI, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(5):760-771.

²³Corona G, Spencer JP, Dessì MA. Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25(4-5):285-293.

Estas sustancias, escasamente ácidas e hidrosolubles, se pierden en el proceso de refinado y, por tanto, no están presentes en los aceites de oliva y orujo sometidos a este proceso.

Así, la composición fenólica de los aceites de oliva varía en cantidad (50–800 mg/L) y calidad dependiendo de la variedad de oliva, la edad del árbol, las técnicas agrícolas utilizadas en el cultivo, el grado de madurez, la composición del suelo, el clima, la técnica de procesamiento y el almacenamiento^{24, 25}.

Es el AOVE la variedad de aceite de oliva en la que se ha demostrado una acción más potente de estos compuestos beneficiosos para la salud en comparación con otros tipos de aceites de oliva.

La fracción fenólica del AOVE es heterogénea, con al menos 36 compuestos fenólicos estructuralmente distintos identificados que se pueden agrupar en diferentes clases²⁶. Estos compuestos fenólicos, por ejemplo, hidroxitirosol y oleuropeína, en el AOVE son responsables de su peculiar sabor y de su alta estabilidad²⁷, y también son responsables de su potente actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora^{28, 29, 30}.

²⁴Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RS. Chemistry and health of olive oil phenolics. Crit Rev Food Sci Nutr. 2009; 49(3):218-236.

²⁵Amarowicz R, Carle R, Dongowski G, Durazzo A, Galensa R, Kammerer D, Maiani G, Piskula MK. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. Mol Nutr Food Res. 2009; 53 Suppl 2:S151-183.

²⁶Deiana M, Serra G, Corona G. Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. Food Funct. 2018; 9(8):4085-4099.

²⁷Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Med Res Rev. 2002; 22(1):65-75.

²⁸Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 541-591.

²⁹Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. Int J Mol Sci. 2016; 17(6).

³⁰Martín-Peláez S, Mosele JI, Pizarro N, Farràs M, de la Torre R, Subirana I, Pérez-Cano FJ, Castañer O, Solà R, Fernandez-Castillejo S, Heredia S, Farré M, Motilva MJ, Fitó M. Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. Eur J Nutr. 2017; 56(1):119-131.

2.2. Dieta Mediterránea

El término “dieta mediterránea” (DM) se refiere a los patrones alimentarios clásicos que han evolucionado en los países que rodean el mar Mediterráneo, donde la esperanza de vida adulta se encuentra entre las más altas del mundo y las tasas de algunas enfermedades crónicas (entre las que se encuentran enfermedades coronarias y algunos tipos de cáncer) están entre las más bajas³¹.

Sin embargo, este término no solo se refiere a una simple pauta nutricional, sino que incluye un estilo de vida equilibrado que recoge recetas, costumbres, productos típicos y actividades humanas diversas, entre las que se encuentran varios tipos de hábitos de vida saludables, como el ejercicio físico.

La DM se considera hoy en día una de las dietas más sanas que existen, con evidencias en el aumento de la longevidad y protección contra las enfermedades cardiovasculares y el cáncer

Los orígenes geográficos y evolutivos de la dieta son de interés ya que abarcan la historia de la civilización occidental. En su forma tradicional, los alimentos en la región eran consumidos según la temporada y el motivo. El clima dictaba lo que se producía en la agricultura, y la razón del consumo era determinada por las reuniones diarias y festividades³².

Actualmente, la popularidad de la DM está aumentando no solo por sus propiedades organolépticas sino también, y principalmente, por los beneficios que confiere para la salud. Esto hace que hoy día se realicen muchos estudios nutricionales, bioquímicos y de otros campos de las ciencias relacionados con los alimentos de la DM y sus componentes³³.

³¹Harwood L, Yaqoob P. Nutritional and health aspects of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104:685–697.

³²Berry EM, Arnoni Y, Aviram M. The Middle Eastern and biblical origins of the Mediterranean diet. *Public Health Nutr.* 2011; 14(12A):2288-2295.

³³Boskou D. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. AOCS Press, Urbana, IL, USA. 2015.

Por todo esto, el patrón dietético mediterráneo, reconocido como Patrimonio Inmaterial de la Humanidad por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO)³⁴, es considerado como el modelo de dieta saludable³⁵.

La DM se caracteriza por una alta ingesta de compuestos fenólicos, que están presentes en los principales alimentos clave de este patrón dietético: AOVE, frutos secos, vino tinto, legumbres, vegetales, frutas y cereales integrales³⁶. Estos alimentos son ricos en compuestos bioactivos como los polifenoles, que están relacionados con efectos antioxidantes, antiinflamatorios, prebióticos y protectores del epitelio a nivel intestinal^{37, 38}.

El aceite de oliva es una parte integral del patrimonio cultural y culinario de los países mediterráneos. Es un producto que se distingue por sus innegables cualidades organolépticas, así como por sus propiedades nutricionales y terapéuticas, que están siendo cada vez más corroboradas por la ciencia³⁹. En los países del sur de Europa, que prefieren esta DM rica en frutas y verduras, el consumo de grasas se realiza principalmente a través del aceite de oliva, lo que, según el autor D. Boskou, representa un 15-30% de la energía dietética total⁴⁰.

³⁴Inscribed on the Representative List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity. UNESCO. 2013. Available from: <https://ich.unesco.org/en/RL/mediterranean-diet-00884> [Accessed December 26, 19].

³⁵Gotsis E, Anagnostis P, Mariolis A, Vlachou A, Katsiki N, Karagiannis A. Health benefits of the Mediterranean Diet: an update of research over the last 5 years. *Angiology*. 2015; 66(4):304-318.

³⁶Castro-Barquero S, Lamuela-Raventós RM, Doménech M, Estruch R. Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity. *Nutrients*. 2018; 10(10):E1523.

³⁷Deiana M, Serra G, Corona G. Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. *Food Funct*. 2018; 9(8):4085-4099.

³⁸Kaulmann A, Bohn T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases-Promises, Perspectives, and Pitfalls. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 9346-9470.

³⁹Harwood J, Aparicio R. Handbook of olive oil, Analysis and Properties. Kluwer Academic Publishers J.L. Harwood, R. Aparicio; 2000.

⁴⁰Boskou D. Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. AOCS Press, Urbana, IL, USA. 2015.

Esta ingesta de AOVE para las poblaciones mediterráneas es de 30 a 50 g/día, lo que equivale a un rango de 4-9 mg/día de fenoles de aceite de oliva virgen ingeridos^{41, 42}.

Se ha demostrado que el AOVE, es uno de los principales responsables de los efectos saludables de la DM⁴³. El AOV, se ha relacionado con una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares e hipertensión^{44, 45, 46}, así como con otros efectos positivos, incluido un posible papel en modulación de las funciones cognitivas^{47, 48}. En concordancia, la DM, también se ha asociado con efectos positivos como la mejora de la salud cardiovascular, la reducción del deterioro cognitivo y menor riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer⁴⁹.

⁴¹Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, De Sanctis P, Giovannini C, D'Archivio M, Masella R. Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18(1):36-50.

⁴²Corona G, Spencer JP, Dessì MA. Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25(4-5):285-293.

⁴³Covas MI, de la Torre R, Fitó M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *Br J Nutr*. 2015; 113 Suppl 2:S19-28.

⁴⁴Williams PT, Fortmann SP, Terry RB, Garay SC, Vranizan KM, Ellsworth N, Wood PD. Associations of dietary fat, regional adiposity, and blood pressure in men. *JAMA*. 1987; 257(23):3251-3256.

⁴⁵Wu GD, Lewis JD. Analysis of the human gut microbiome and association with disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11(7):774-777.

⁴⁶Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Segarra AB, Martínez-Cañamero M, Prieto I. Influence of extra virgin olive oil on blood pressure and kidney angiotensinase activities in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med*. 2015; 81(8):664-669.

⁴⁷Segarra AB, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, Ramírez-Sánchez M, de Gasparo M, Banegas I, Martínez-Cañamero M, Vives F, Prieto I. The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities. *Horm Metab Res*. 2011; 43(2):86-91.

⁴⁸Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Methods*. 1999; 36(3):167-179.

⁴⁹Ye X, Scott T, Gao X, Maras JE, Bakun PJ, Tucker KL. Mediterranean diet, healthy eating index 2005, and cognitive function in middle-aged and older Puerto Rican adults. *J Acad Nutr Diet*. 2013; 113(2):276-281.e1-3.

También se ha demostrado que la DM y el AOVE parecen proteger contra el cáncer de colon^{50, 51, 52}. Estudios recientes relacionan una asociación del aceite de oliva con otros componentes de la DM con una reducción en la iniciación y progresión de este tipo de cáncer⁵³.

2.3. Microbiota intestinal y su relación con la dieta

Durante muchos años, se pensó que la función del intestino grueso era reabsorber el agua y las sales y eliminar los restos de alimentos no utilizados. Ahora es evidente que la microbiota intestinal (MI) juega un papel importante, si no crucial, en el metabolismo de compuestos químicos que se encuentran dentro de los alimentos. El gran número de bacterias que habitan en el intestino grueso forma un alto ecosistema complejo llamado el “microbioma intestinal”⁵⁴. El término “microbioma” fue introducido por primera vez en 2001 para definir el conjunto de genomas de la microbiota⁵⁵.

El intestino humano está colonizado por una enorme cantidad de microorganismos, principalmente bacterias. Se estima que la microbiota de un adulto humano está compuesta por entre 10 y 100 billones células bacterianas, cuyo genoma es unas 150 veces mayor que el de células humanas⁵⁶.

⁵⁰Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S. Food groups and colorectal cancer risk. *Br J Cancer*. 1999; 79(7-8): 1283–1287.

⁵¹Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J Epidemiol Community Health*. 2000; 54:756-760.

⁵²Deiana M, Serra G, Corona G. Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. *Food Funct*. 2018; 9(8):4085-4099.

⁵³Farinetti A, Zurlo V, Manenti A, Coppi F, Mattioli AV. Mediterranean diet and colorectal cancer: A systematic review. *Nutrition*. 2017; 43-44:83-88.

⁵⁴Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: A review. *Eur J Nutr*. 2015; 54(3):325-341.

⁵⁵Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. 2001; 292(5519):1115-1118.

⁵⁶Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.

La composición, así como la proporción de diferentes especies que forman el microbioma intestinal, son muy diversas dentro de la población humana⁵⁷. La composición del ecosistema intestinal humano está influenciada por múltiples y diversos factores, tales como la edad, el origen, el medio ambiente, los hábitos dietéticos (incluidos probióticos) y la aplicación de antibióticos. Por lo tanto, cada individuo tiene su propio perfil único de especies microbianas, que se pueden comparar a una huella dactilar. Debido a la multitud de interacciones directas e indirectas con el organismo hospedador, el microbioma intestinal está estrechamente vinculado a la salud del hospedador^{58, 59}.

En los últimos diez años el efecto de la dieta en los taxones microbianos prevalentes que habita en el intestino⁶⁰, y la posible influencia de un desequilibrio o disbiosis microbiana intestinal en la fisiología animal⁶¹ ha sido ampliamente reconocido (tabla 2).

⁵⁷Dicksved J. Exploring the human intestinal microbiome in health and disease. Dissertation, Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae 2008:30. Uppsala. https://pub.epsilon.slu.se/1760/1/Dicksved_Thesis_Kapman.pdf [Accessed 26 Dec 2019].

⁵⁸Saarela M, Lähteenmäki L, Crittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. Gut bacteria and health foods - the European perspective. *Int J Food Microbiol.* 2002; 78(1-2):99-117.

⁵⁹Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(14):1818–1892.

⁶⁰Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011; 473(7346):174-180.

⁶¹Albenberg LG, Wu GD. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology.* 2014; 146(6):1564-1572.

Dieta	Microbiota afectada	Efecto en la microbiota
Alta en grasas	<i>Bifidobacteria</i> spp.	Disminución
Alta en grasas y en azúcares	<i>Clostridium innocuum</i> , <i>Catenibacterium mitsuokai</i> and <i>Enterococcus</i> spp.	Aumento
	<i>Bacteroides</i> spp.	Disminución
Reducida en carbohidratos	<i>Bacteroidetes</i>	Aumento
Restricción de calorías	<i>Clostridium coccoides</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. and <i>Bifidobacteria</i> spp.	Disminución
	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> and <i>Enterobacteriaceae</i>	Disminución
Carbohidratos complejos	<i>B. longum</i> subspecies <i>longum</i> , <i>B. breve</i> and <i>B.</i> <i>thetaiotaomicron</i>	Aumento
	<i>C. difficile</i> and <i>C.</i> <i>perfringens</i>	Aumento
Azúcares refinados	<i>E. coli</i>	Disminución
Vegetariana	<i>Bacteroides</i>	Disminución
Alta en ácidos grasos poliinsaturados n-6	<i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> and <i>Proteobacteria</i>	Aumento
	δ - <i>Proteobacteria</i>	Aumento
Grasa láctea animal	δ - <i>Proteobacteria</i>	Aumento

Tabla 2: Efecto de la dieta sobre la composición de la MI. Adaptación de Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*. 2012; 4(8):1095-1119.

Los microorganismos intestinales tienen un papel esencial en la homeostasis del hospedador y una ecología microbiana colónica perturbada puede conducir a numerosos trastornos de diferentes tipos, no solo digestivos sino también metabólicos o incluso cognitivos a través del eje intestino-cerebro, ya que estudios recientes demuestran que las comunidades microbianas que

residen en el intestino desempeñan un papel importante en la comunicación entre el intestino y el cerebro a través de rutas neuronales, inmunitarias y hormonales⁶².

La dieta tiene una marcada influencia en la MI, generando diferentes enterotipos⁶³ con una composición predecible⁶⁴ según el tipo de dieta consumida. En particular, se ha demostrado claramente que la ingesta de grasas en la dieta es un factor importante que influye en el patrón de la MI⁶⁵ y en la relación *Bacteroidetes/Firmicutes*⁶⁶, que son los filos más abundantes de la MI humana.

Por lo tanto, la MI ha surgido como un factor nuevo e importante a considerar en las consecuencias negativas de las dietas ricas en grasa⁶⁷.

⁶²Ranuh R, Athiyyah AF, Darma A, Risky VP, Riawan W, Surono IS, Sudarmo SM. Effect of the probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506 on BDNF and 5HT stimulation: role of intestinal microbiota on the gut-brain axis. Iran J Microbiol. 2019; 11(2):145-150.

⁶³Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature. 2011; 473(7346):174-180.

⁶⁴Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon JI. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. Science. 2011; 333(6038):101-104.

⁶⁵Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. Pharmacol Res. 2013; 69(1):52-60.

⁶⁶Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(31):11070-11075.

⁶⁷Martínez I, Wallace G, Zhang C, Legge R, Benson AK, Carr TP, Moriyama EN, Walter J. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(12):4175-4184.

2.4. Microbiota intestinal y aceite de oliva

La ingesta de grasas en la dieta determina la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares y desempeña un papel bien reconocido en el riesgo cardiovascular y en el desarrollo de enfermedades cardio-metabólicas como las que se incluyen en el concepto de síndrome metabólico (SM)⁶⁸.

El SM puede definirse como un conjunto de factores asociados e interrelacionados entre sí (obesidad visceral, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensión arterial) que inducen un mayor riesgo de padecer diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares (EC). Se ha considerado que el SM está ligado a causas genéticas y ambientales, entre ellas, una dieta desequilibrada.

Durante los últimos años ha habido un gran número de informes sobre el efecto de la dieta en la composición de la MI, definiendo diferentes enterotipos según la dieta⁶⁹ e incluso proponiendo un modelo matemático que nos permite predecir la MI según esta variable⁷⁰.

⁶⁸Segarra AB, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, Ramírez-Sánchez M, de Gasparo M, Banegas I, Martínez-Cañamero M, Vives F, Prieto I. The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities. *Horm Metab Res.* 2011; 43(2):86-91.

⁶⁹Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011; 473(7346):174-180.

⁷⁰Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon JI. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science.* 2011; 333(6038):101-104.

Dentro de este campo, hay un marcado interés en las dietas altas en grasas debido a los efectos negativos en la población, principalmente a través de su relación con el SM^{71, 72}. Varios estudios han informado que las dietas ricas en grasas alteran la MI en ratones^{73, 74, 75} y esta alteración parece ser responsable de algunas de las alteraciones patológicas observadas en el SM^{76, 77, 78}.

Ya que la MI está compuesta por numerosas bacterias, distribuidas en un gran número de taxones con complejas relaciones ecológicas entre ellos y con una cada vez más evidente comunicación con el huésped, podemos pensar que los cambios en esta MI podrían tener un efecto concomitante en el organismo⁷⁹.

⁷¹Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*. 2004; 23(4):447-456.

⁷²Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(7):1761-1772.

⁷³Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(7):1761-1772.

⁷⁴Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*. 2012; 7(10):e47713.

⁷⁵Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Br J Nutr*. 2013; 109(5):802-809.

⁷⁶Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(7):1761-1772.

⁷⁷Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Philippe C, Walker F, Bado A, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*. 2013; 62(12):1787-1794.

⁷⁸Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J*. 2010; 4(2):232-241.

⁷⁹Sunkara T, Rawla P, Ofosu A, Gaduputi V. Fecal microbiota transplant - A new frontier in inflammatory bowel disease. *J Inflamm Res*. 2018; 11:321-328.

La creciente evidencia sugiere que el patrón de MI afecta el balance energético del cuerpo⁸⁰, lo que conduce significativamente al desarrollo de obesidad, inflamación asociada a la obesidad y resistencia a la insulina, todos ellos factores involucrados en el SM^{81, 82, 83}. Las modificaciones en el patrón de la MI se han relacionado con altos niveles de presión arterial (PA) que muestran ciertos modelos de hipertensión, como los observados en ratas espontáneamente hipertensas (SHR, del inglés Spontaneous Hypertensive Rats)⁸⁴.

Si se considera que el intestino grueso es un fermentador o un biorreactor, también parece razonable considerar que los alimentos y el tipo de dieta pueden ser el principal o uno de los principales factores que ejercen un efecto sobre la microbiota que prospera en su interior. Por lo tanto, cuando esta dieta presenta ciertas consecuencias fisiológicas, no es ilógico considerar que estas variaciones podrían producirse, al menos en parte, como efecto de los cambios ocurridos en el metabolismo global bacteriano, siendo este paso necesario para el resultado fisiológico. Este supuesto es especialmente lógico cuando las correlaciones entre los rasgos biológicos y la presencia bacteriana son estadísticamente significativas y, por lo tanto, se demuestra que existe un vínculo. Sin embargo, la correlación no es necesariamente causal y las dos variables pueden cambiar de forma concomitante por diferentes razones. Una variable puede afectar a la otra o viceversa o simplemente podría suceder que ambas se vean igualmente afectadas por la dieta específica, sin ninguna interacción entre el taxón microbiano y la variable fisiológica.

⁸⁰Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006; 444(7122):1022-1023.

⁸¹Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. 2013; 34:(1):39-58.

⁸²Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37(2):216-223.

⁸³Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Philippe C, Walker F, Bado A, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*. 2013; 62(12):1787-1794.

⁸⁴Jose PA, Raj D. Gut microbiota in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015; 24(5):403-409.

Durante años, nutricionistas e investigadores han afirmado que el impacto de los lípidos es diferente dependiendo de su grado de saturación^{85, 86} y, por lo tanto, este efecto diferente tiene resultados concomitantes también en el perfil de microbiota⁸⁷.

En comparación con las dietas enriquecidas con ácidos grasos saturados, las dietas con un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados (por ejemplo, en el caso del aceite de oliva) se han asociado con un menor efecto estimulante sobre el aumento de peso y la acumulación de lípidos hepáticos.

Estos efectos se relacionaron, utilizando un microchip de ADN o microarray de tipo filogenético, con los cambios inducidos por la dieta observados en la MI⁸⁸. En particular, los ácidos grasos monoinsaturados se consideran particularmente saludables⁸⁹, y entre ellos, el aceite de oliva se ha estudiado ampliamente debido a su papel predominante en la DM y sus apreciadas características sensoriales⁹⁰.

⁸⁵Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res.* 2011; 50(4):372-387.

⁸⁶Huang CW, Chien YS, Chen YJ, Ajuwon KM, Mersmann HM, Ding ST. Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10).

⁸⁷Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes (Lond).* 2013; 37(2):216-223.

⁸⁸de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C, de Vogel-van den Bosch J, Kleerebezem M, Müller M, van der Meer R. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 303(5):G589-599.

⁸⁹Gillingham LG, Harris-Janz S, Jones PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids.* 2011; 46(3):209-228.

⁹⁰Martínez-González MÁ, Martín-Calvo N. The major European dietary patterns and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013; 14(3):265-271.

Existe un acuerdo general en relacionar el consumo regular de AOV en la dieta con una menor incidencia de SM⁹¹. Esto se ha analizado en estudios basados en el AOV como el aceite más ampliamente utilizado como la grasa principal en el núcleo de la DM, y se ha sugerido que es beneficioso en el tratamiento de enfermedades que involucran inflamación crónica, como el SM⁹².

Estas propiedades beneficiosas se han atribuido no solo a la composición de los ácidos grasos, sino también a la materia insaponificable, principalmente el contenido de polifenoles⁹³. Esto se debe a que el AOV también está enriquecido en algunos componentes minoritarios, como los polifenoles, que son bien conocidos por su actividad antimicrobiana sobre ciertas bacterias⁹⁴, así como por sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes⁹⁵. Debido a este comportamiento, la influencia específica de los polifenoles en la MI se ha estudiado de manera similar en varios alimentos^{96,97}.

⁹¹Martínez-González MA, García-Arellano A, Toledo E, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, Covas MI, Schröder H, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Ruiz-Gutiérrez V, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Muñoz MA, Wärnberg J, Ros E, Estruch R; PREDIMED Study Investigators. A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One*. 2012; 7(8):e43134.

⁹²Babio N, Bulló M, Basora J, Martínez-González MA, Fernández-Ballart J, Márquez-Sandoval F, Molina C, Salas-Salvadó J; Nureta-PREDIMED Investigators. Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009; 19(8):563-570.

⁹³Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PLoS One*. 2013; 8(8):e71702.

⁹⁴Medina E, Brenes M, Romero C, García A, de Castro A. Main antimicrobial compounds in table olives. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(24):9817-9823.

⁹⁵Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PLoS One*. 2013; 8(8):e71702.

⁹⁶Anhê FF, Varin TV, Le Barz M, Desjardins Y, Levy E, Roy D, Marette A. Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts. *Curr Obes Rep*. 2015; 4(4):389-400.

⁹⁷Roopchand DE, Carmody RN, Kuhn P, Moskal K, Rojas-Silva P, Turnbaugh PJ, Raskin I. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes*. 2015; 64(8):2847-2858.

Sin embargo, como también se indicó anteriormente, no todos los aceites de oliva comerciales tienen el contenido de polifenol intacto.

El AOV se extrae mecánicamente de aceitunas sin intervención química y contiene cantidades relativamente altas de compuestos fenólicos y tocoferoles. En contraste, si la acidez del AOV es demasiado alta, puede someterse a un tratamiento químico para mejorar esta condición y luego se transforma en AOR.

El AOR tiene la misma composición de ácidos grasos que el aceite virgen del que se deriva, pero pierde la mayoría de los componentes minoritarios en el proceso, así como la palatabilidad y el bouquet⁹⁸. Es por esto que se comercializa solo después de que se haya agregado 10-15% de AOV, lo que mejora sus propiedades organolépticas. De hecho, el AOV tiene un contenido promedio de polifenoles de 150 a 400 mg/kg, mientras que el AOR solo tiene una presencia residual (0 a 5 mg/kg)⁹⁹.

La pérdida de la materia insaponificable es importante, ya que podría cambiar algunas de las propiedades saludables atribuidas al AOV. Se magnifica esta importancia por el hecho de que la comercialización de AOR es significativa ya que, según el Ministerio de Agricultura, hubo un 60% de consumo de esta grasa frente al 40% de los AOV y AOVE durante 2016 en España¹⁰⁰. Además, los consumidores estadounidenses prefieren el AOR frente algunos AOV, probablemente debido a su sabor más suave¹⁰¹.

⁹⁸Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J. Nutr.* 1999; 129:2177–2183.

⁹⁹Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols, *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(3).

¹⁰⁰Informe del Consumo de Alimentación en España 2016. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Servicio de Publicaciones del MAPAMA. Madrid, España. 2017.

¹⁰¹Vázquez-Araújo L, Adhikari K, Chambers E 4th, Chambers DH, Carbonell-Barrachina AA. Cross-cultural perception of six commercial olive oils: A study with Spanish and US consumers. *Food Sci Technol Int.* 2015; 21(6):454-466.

A pesar de todos estos hechos, pocos estudios científicos se han centrado en la influencia del AOR en la salud^{102, 103} y ninguno de ellos ha estudiado su efecto sobre la MI. Conscientes de esto, incluimos AOR comerciales en el análisis realizado por nuestro grupo de investigación.

En esta línea de investigación abordada desde hace varios años gracias a la colaboración entre los grupos PAI-AGR230 y BIO221, se alimentó a varios grupos de ratones con distintas dietas (figura 5), utilizando distintos niveles y fuentes lipídicas. Un total de 36 ratones fueron divididos en 4 grupos: un grupo alimentado con pienso estándar (ST), otro alimentado con pienso estándar suplementado en un 20% de mantequilla (M) como ejemplo de grasa saturada y dos grupos alimentados con un 20% de AOR o AOVE como ejemplos de grasas insaturadas.

Tras de doce semanas de dieta y el sacrificio de los animales, se analizó la población presente en el tracto gastrointestinal y variables como la ingesta de alimento, peso corporal, glucemia en ayunas, ingesta de agua, diuresis, balance hídrico, PA, colesterol HDL y LDL, ratio HDL/LDL, triglicéridos, leptina, ghrelina, insulina, GLP1 y óxido nítrico.

Se observó que algunos de estos factores, como la composición corporal de los animales, el metabolismo de la glucosa, la relación HDL/LDL y a la PA, se vieron afectados de manera directa según el tipo y el origen de la grasa utilizada en cada dieta.

El grupo de ratones alimentado con la dieta M presentó al final del periodo experimental, un nivel significativamente menor de ingesta que el resto de grupos, a pesar de lo cual, este mismo grupo presentó un mayor peso corporal, mayores valores de colesterol en plasma y PA sistólica (PAS), con respecto a los demás grupos.

¹⁰²(Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. J. Nutr. 1999; 129:2177–2183.

¹⁰³Pacheco YM, López S, Bermúdez B, Abia R, Muriana FJ. Extra-virgin vs. refined olive oil on postprandial hemostatic markers in healthy subjects. J Thromb Haemost. 2006; 4(6):1421-1422.

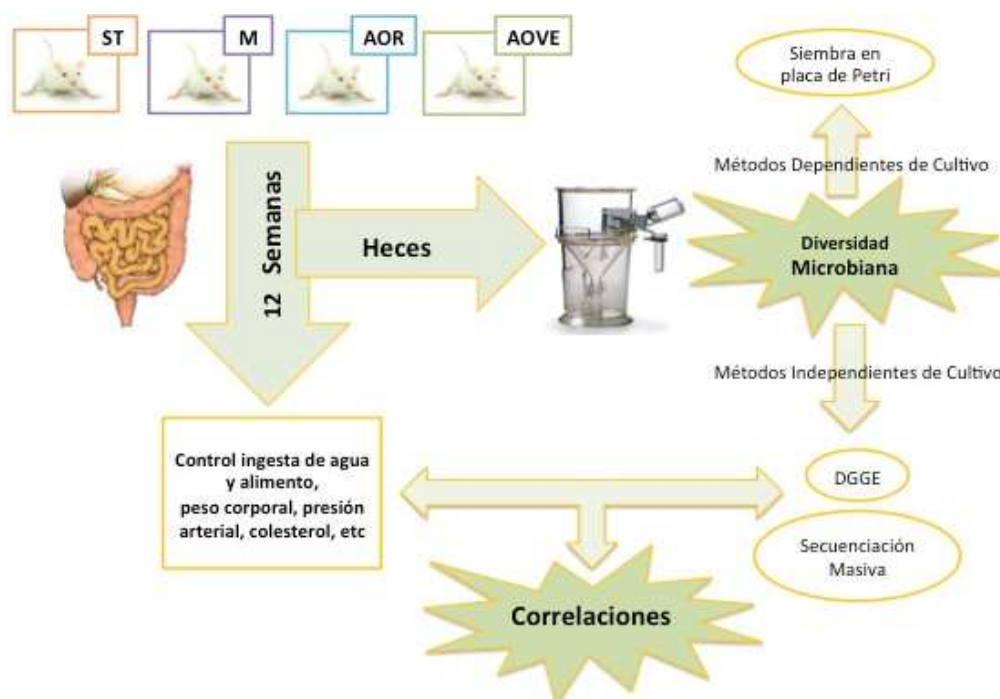


Figura 5: Esquema global del estudio del efecto del aceite de oliva virgen sobre la microbiota intestinal de roedores y su correlación con diferentes variables fisiológicas. ST: dieta estándar; M: mantequilla; AOR: aceite de oliva refinado; AOVE: aceite de oliva virgen extra; DGGE: Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante. Fuente: Hidalgo M, Prieto I, Martínez-Cañamero M. Dieta rica en Aceite de Oliva Virgen Extra y Microbiota Intestinal. *Aldaba*. 2018; 43:101-110.

El grupo alimentado con AOVE presentó valores de PA significativamente más bajos a las seis semanas y colesterol en plasma alto también al final, aunque con una mayor ratio HDL/LDL y menores niveles de triglicéridos que los otros grupos con dieta alta en grasa¹⁰⁴.

El estudio de las heces de estos mismos grupos de roedores, demostró que una dieta alta en grasa provoca cambios en la composición de la MI. Como ya se ha mencionado anteriormente, cambios en la composición de la dieta a largo plazo pueden producir diferencias en la abundancia relativa de los dos grandes grupos de microorganismos: *Firmicutes* y *Bacteroides*.

¹⁰⁴Martínez-Cañamero M, Segarra AB, Hidalgo M, Villarejo AB, Abriouel H, Navas J, Gálvez A, Ramírez M, Prieto I. Efecto de la ingesta de aceites de oliva con distinto contenido en polifenoles sobre la microbiota gastrointestinal. Relación con el síndrome metabólico. "Proyectos de Investigación 2010-2011", Universidad de Jaén. 2013; 46-76.

Sin embargo, en nuestro estudio, estos cambios fueron menos drásticos en el grupo que siguió una dieta enriquecida en AOVE que en el grupo M: en el grupo de la dieta enriquecida en M hay cambios estadísticamente significativos en las primeras seis semanas, mientras que en el de AOVE los cambios ocurrieron más tarde y se mantuvieron no estadísticamente significativos a lo largo del tiempo¹⁰⁵.

El análisis indicó que en ratones alimentados con pienso ST los recuentos de *Firmicutes* fueron significativamente más bajos. En cambio, en los ratones alimentados con dietas altas en grasas, estas diferencias no fueron notables durante las primeras seis semanas, salvo en el caso de la M en el que se observó una inversión en la abundancia de los dos grupos taxonómicos microbianos.

Finalizado el estudio a las doce semanas, tanto la dieta M como la del AOR mostraron diferencias significativas con respecto al grupo ST. El grupo de AOVE no presentó diferencias estadísticamente significativas. En este sentido, podemos decir que sería posible detectar comportamientos diferentes en la MI, a lo largo del tiempo, cuando se ingieren ambos tipos de aceite: AOVE y AOR¹⁰⁶.

Para obtener el perfil genético de la población microbiana presente en cada muestra de heces se llevó a cabo una electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) (figura 6).

Este ensayo indicó que la microbiota de ratones alimentados con cada dieta era mayoritariamente más similar entre sí al final del experimento que al principio, siendo la dieta ST la que más difería de las demás. Concretamente, se encontraron cambios importantes en las bacterias del ácido láctico, de manera que al principio se detectó poca representación de estas bacterias en todas las dietas. Sin embargo, se produjo un importante aumento en el número de bandas a tiempo final con un total de siete bandas, seis de ellas encontradas en la dieta de M y tan sólo una en el grupo con AOVE.

¹⁰⁵Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut Microbiota. Comparison to butter. Food Res Int. 2014; 64:553-559.

¹⁰⁶Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut Microbiota. Comparison to butter. Food Res Int. 2014; 64:553-559.

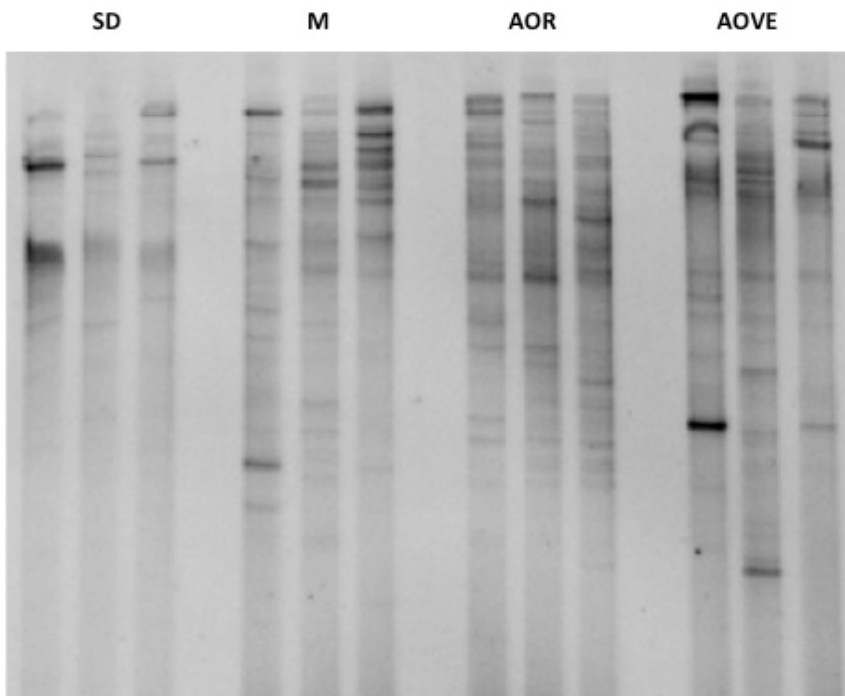


Figura 6: Estudio microbiológico independiente de cultivo (análisis mediante DGGE) de los microorganismos presentes en las heces de ratones tras 12 semanas de administración de las dietas. ST: dieta estándar; M: mantequilla; AOR: aceite de oliva refinado; AOVE: aceite de oliva virgen extra. Fuente: Hidalgo M, Prieto I, Martínez-Cañamero M. Dieta rica en Aceite de Oliva Virgen Extra y Microbiota Intestinal. *Aldaba*. 2018; 43:101-110.

Además, en el grupo M se encontró *Lactobacillus reuteri*, relacionada por muchos autores¹⁰⁷ con la obesidad asociada a la MI. Este hecho coincide con el aumento de peso en los ratones que consumieron esta dieta. En cambio, la única banda perteneciente al género *Lactobacillus* que se detectó en el grupo AOVE pertenece a *Lactobacillus casei*, presente en la microbiota intestinal de individuos no obesos¹⁰⁸.

¹⁰⁷Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R, Raccach D, Vialettes B, Raoult D. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)*. 2012; 36(6):817-825.

¹⁰⁸Zarrati M, Shidfar F, Nourijelyani K, Mofid V, Hossein zadeh-Attar MJ, Bidad K, Najafi F, Gheflati Z, Chamari M, Salehi E. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *Biofactors*. 2013; 39(6):633-643.

Animados por estos resultados prometedores se continuó el proyecto ampliando el número de ratones estudiados por dieta y utilizando un enfoque metagenómico del ADN ribosomal 16S. De esta manera comparamos la dieta ST y las dos dietas ricas en grasas enriquecidas en mantequilla M y AOVE, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron claras diferencias tanto en el perfil de microbiota fecal como en varias variables fisiológicas relacionadas con el SM.

Algunas de estas variables mantuvieron correlaciones estadísticamente significativas con los porcentajes de varios taxones que aumentaron en la dieta enriquecida con mantequilla, pero no en la de AOVE¹⁰⁹.

También, se realizó un estudio centrado en la PA para contribuir a analizar, en el caso de esta correlación específica, si los cambios en la abundancia de los taxones de bacterias eran la causa o la consecuencia de las alteraciones fisiológicas observadas (figura 7). Este trabajo se llevó a cabo aprovechando un estudio que en el grupo BIO221 se estaba llevando a cabo con SHR.

En el estudio, animales SHR se alimentaron con una dieta ST y otra enriquecida en AOVE durante doce semanas y en ambos grupos se observó un aumento progresivo de la PA. Sin embargo, estos valores fueron siempre más bajos en el grupo alimentado con AOVE.

Al final del experimento, el grupo ST presentó valores de PA que eran un 20% superiores a los valores obtenidos en el grupo AOVE¹¹⁰.

¹⁰⁹Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹¹⁰Villarejo AB, Prieto I, Segarra AB, Banegas I, Wangenstein R, Vives F, de Gasparo M, Ramírez-Sánchez M. Relationship of angiotensinase and vasopressinase activities between hypothalamus, heart, and plasma in L-NAME-treated WKY and SHR. Horm Metab Res. 2014; 46(8):561-567.

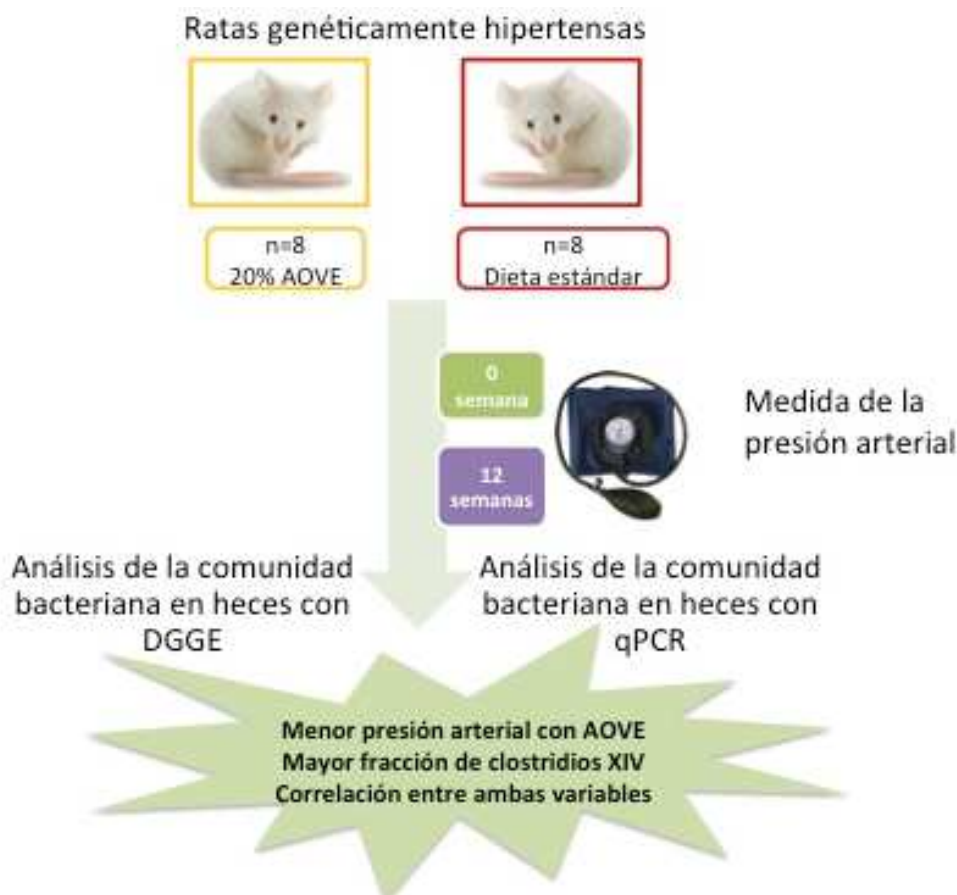


Figura 7: Esquema del estudio del efecto del aceite de oliva virgen sobre la microbiota intestinal de ratas genéticamente hipertensas. Fuente: Hidalgo M, Prieto I, Martínez-Cañamero M. Dieta rica en Aceite de Oliva Virgen Extra y Microbiota Intestinal. Aldaba. 2018; 43:101-110.

Nuestro grupo de trabajo realizó el análisis de las comunidades bacterianas presentes en las heces de estos animales SHR mediante DGGE. Los resultados mostraron diferencias entre ambos grupos: el grupo con AOV presentó una mayor densidad de bandas, así como un mayor número de bandas presentes en los perfiles de todos los animales.

Esto fue ratificado al llevar a cabo un dendrograma de todos los perfiles del gel, que mostró cómo los microbiomas de prácticamente todos los animales ST estaban agrupados en una sola ramificación, distantes de los de AOVE, que se agrupaban en dos. Al secuenciar las bandas obtenidas, encontramos que los perfiles de AOVE mostraban tres bandas que se correspondieron con el grupo *Clostridium* XIVa y una banda perteneciente al género *Lactobacillus*.

Estos resultados fueron confirmados mediante una qPCR, donde ambos grupos bacterianos presentaron mayor abundancia relativa en las heces de ratones alimentados con AOV¹¹¹.

El grupo *Clostridium* XIVa es uno de los tres principales grupos de bacterias anaerobias estrictas presentes en el intestino y generalmente representa la mayoría de los aislados intestinales capaces de producir butirato¹¹². Este dato es significativo, ya que el butirato se considera fuente de energía para las células epiteliales del colon, donde se cree que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud intestinal en los seres humanos. Recientemente se ha apuntado a que el grupo filogenético *Clostridium* XIVa correlaciona de manera negativa con el desarrollo de masa grasa¹¹³. También se han relacionado las sales de butirato con la reducción en la PA¹¹⁴, por lo que sería interesante considerar el papel de la producción de butirato intestinal por parte del grupo *Clostridium* XIVa en la disminución de presión observada.

De este modo, mediante este estudio en SHR se demostró una correlación negativa entre la mayor abundancia relativa de *Clostridium* XIVa presente en el grupo alimentado con AOVE y los valores de PA obtenidos. Este dato es muy similar al obtenido tras secuenciación masiva en ratones alimentados con una dieta enriquecida en AOVE, mostrado en las líneas anteriores. En ambos casos no es posible determinar si los cambios en la abundancia de estos grupos microbianos fueron una causa o una consecuencia de las diferencias en los valores de PA observados.

¹¹¹Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. *Plant Foods Hum Nutr.* 2018; 73(1):1-6.

¹¹²Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal *Clostridia*: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.* 2013 Aug 13;5(1):23.

¹¹³Neyrinck AM, Possemiers S, Verstraete W, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. 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. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(1):51-59.

¹¹⁴Kumar P, Periyasamy R, Das S, Neerukonda S, Mani I, Pandey KN. All-trans retinoic acid and sodium butyrate enhance natriuretic peptide receptor a gene transcription: role of histone modification. *Mol Pharmacol.* 2014; 85(6):946-957.

Sin embargo, en el estudio con SHR, el hecho de utilizar animales que ya son hipertensos de forma espontánea puede apoyar la idea de que el grupo bacteriano es el que causó la disminución de la PA.

Como se ha explicado anteriormente, en el estudio realizado utilizando un enfoque metagenómico del ADN ribosomal 16S¹¹⁵, sólo se compararon una dieta ST y dos dietas ricas en grasas enriquecidas en mantequilla M y AOVE, respectivamente.

Como el AOR no se incluyó en ese momento, en el presente estudio hemos ampliado el análisis anterior incorporando una dieta enriquecida en AOR comercial para dilucidar las diferencias en los taxones microbianos entre esta y las otras dietas y para buscar posibles correlaciones con variables fisiológicas en el huésped. Los resultados obtenidos no solo pueden agregar nuevos datos a la influencia de AOR en la salud sino también al papel específico de los polifenoles en el efecto ejercido por el AOV.

¹¹⁵Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El trabajo multidisciplinar que actualmente estamos llevando a cabo microbiólogos y fisiólogos está demostrando que el aceite de oliva virgen afecta a la microbiota intestinal de forma diferente a la de otras grasas, lo que nos animó a embarcarnos a llevar a cabo la secuenciación masiva del gen ARNr 16S de todas las microbiotas fecales. Mediante esta novedosa técnica, hemos observado una variación clara entre determinadas familias bacterianas dependiendo del tipo de grasa utilizada. Igualmente, hemos observado variaciones en grupos minoritarios, pero con una correlación notable con variables fisiológicas relacionadas con el síndrome metabólico y el riesgo cardiovascular, como el aumento de la presión arterial sistólica o la disminución en la relación HDL/LDL.

En la presente memoria de tesis hemos querido ampliar este estudio haciendo una comparativa entre aceite de oliva virgen extra y aceite de oliva refinado, lo que pondrá de manifiesto, en caso de diferencias, la importancia de los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen.

Nuestra HIPÓTESIS DE PARTIDA es, por tanto, que el efecto de la ingesta continuada de una dieta alta en aceite de oliva refinado tiene un efecto diferente al ejercido por el aceite de oliva virgen sobre la microbiota intestinal y/o sus correlaciones con diferentes variables fisiológicas del hospedador. Nuestro OBJETIVO GENERAL es encontrar estas diferencias y establecer, en lo posible, una teoría acerca del efecto de los componentes minoritarios en la microbiota intestinal.

3.1. Objetivos específicos

- 1.** Contribuir a establecer cómo influye una dieta rica en acetite de oliva refinado en comparación con una de aceite de oliva virgen sobre la microbiota intestinal murina, llevando a cabo estudios de diversidad y variabilidad mediante índices estadísticos y minería de datos en los grupos de secuencias obtenidos por secuenciación masiva.
- 2.** Realizar estudios estadísticos para establecer posibles correlaciones entre estas modulaciones y cambios en los valores de diferentes variables fisiológicas en el hospedador.

3. Construir colecciones de cepas aisladas a partir de las heces de ratones alimentados con diferentes dietas altas en grasa y, en lo posible, identificar dichas cepas entre los diferentes OTUs (operational taxonomical units) obtenidos por secuenciación masiva.
4. Llevar a cabo una caracterización de la colección de cepas que permita identificarlas en la bibliografía científica o como de nueva descripción y que incluya, siempre que sea posible, el comportamiento “in vitro” frente al aceite de oliva – tanto virgen como refinado.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Objetivos 1 y 2

4.1.1. Animales

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales descritos con anterioridad para tres de las cuatro dietas¹¹⁶ (ST; dieta estándar de ratones de laboratorio A04, 3% de grasa, Panlab, Barcelona, España) (n = 8) o dos dietas altas en grasa (35% de energía total) que contenían mantequilla (n = 9) (M; pienso estándar Panlab A04) suplementado con 20% de mantequilla) o AOVE (n = 9) (AOVE; pienso estándar Panlab A04 suplementado con 20% de aceite de oliva virgen extra) respectivamente. El AOVE se obtuvo de un cultivo completamente orgánico (Soler Romero, Alcaudete, España; 37° 33' 6.2928000 00012289" N, 4° 1' 35.68799999988187" W). La mantequilla se obtuvo de una gran superficie (Hacendado, Mercadona, Jaén; 37 ° 47' 16.240199999994644" N, 3° 47' 5.31419999977 5182" W). Se realizó la caracterización y el porcentaje de ácidos grasos (AOVE 78,6% ácidos grasos monoinsaturados -MUFA-, 4,2% de ácidos grasos poliinsaturados -PUFA-, 17,1% de grasas saturadas ácidos -SFA-; Mantequilla 35,6% MUFA, 1,5% PUFA, 62,5% SFA) y el contenido de polifenoles de AOVE se obtuvo del productor (el contenido total de polifenoles fue de 527 mg/kg).

En este trabajo, también se añadió un cuarto grupo experimental alimentado con dieta AOR, que consta de pienso enriquecido en aceite de oliva refinado hasta alcanzar el 35% de la energía total. Como en Prieto *et al.*¹¹⁷, se utilizó pienso estándar Panlab A04, pero esta vez se complementó con un 20% de aceite de oliva refinado en lugar de aceite de oliva virgen o mantequilla. La tabla 3 muestra la composición de las cuatro dietas. Durante un período de 12 semanas, alimentamos ad libitum 8 ratones Swiss Webster machos con dieta ST y 9 ratones con dietas AOVE, M y AOR, respectivamente, sumando un total de 35 ratones.

¹¹⁶Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹¹⁷Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

Dieta	ST		AOVE		AOR		M	
Composición	g/100 g	% energía	g/100 g	% energía	g/100 g	% energía	g/100 g	% energía
Proteínas	16,5	20	16,5	14	16,5	14	16,5	14
Carbohidratos	60	72	55	48	55	48	55	48
Grasas	3	8	20	35	20	35	20	35
Energía total (kJ/g)	14,2		19,6		19,6		19,6	

Tabla 3. Composición de nutrientes y contenido de energía de dieta estándar (ST) y dietas con alto contenido en grasas enriquecidas con aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de oliva refinado (AOR) y mantequilla M).

El AOVE y la mantequilla se obtuvieron y caracterizaron como se indica en el citado artículo¹¹⁸. El AOR se obtuvo de una gran cadena comercial (Hacendado, Mercadona, Jaén; 76,6% MUFA, 7,1% PUFA, 16,3% SFA).

Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Jaén de conformidad con 86/609/CEE, inicialmente el 29 de diciembre de 2010 para el proyecto AGR 6340 y ampliado para el proyecto PP2015/08/09.

El procedimiento se siguió como se describió anteriormente¹¹⁹. Los ratones se mantuvieron a temperatura constante (23°C), humedad constante (50%) y con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad. Veinticuatro horas antes del sacrificio, se colocaron individualmente en jaulas metabólicas para determinar la ingesta de alimentos, la ingesta de agua y la diuresis. Previo al metabolismo, se determinó el peso corporal y la presión arterial sistólica de cada animal por pletismografía.

¹¹⁸Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹¹⁹Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

Después de doce semanas del inicio del periodo experimental, se tomó una muestra de las heces de cada ratón se justo después de la deposición, y el ADN total se extrajo inmediatamente como se indica a continuación, o se mantuvo a -80°C hasta su uso. La presión arterial sistólica fue determinada como se describió anteriormente^{120, 121}.

Al final del período de doce semanas y después de recoger todos los datos (ingesta de alimentos y agua, diuresis, peso corporal y presión arterial sistólica) y las heces, los animales fueron anestesiados, y se obtuvieron muestras de sangre a través del ventrículo cardíaco izquierdo.

Finalmente, fueron sacrificados tras perfusión con solución salina a través del mismo ventrículo¹²². Se midieron los niveles en plasma de insulina, glucosa en ayunas, triglicéridos, colesterol total y HDL^{123, 124, 125}.

¹²⁰Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹²¹Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Duran R, Luna Jde D, Segarra AB, Hermoso F, Ramírez M. Asymmetrical response of aminopeptidase A and nitric oxide in plasma of normotensive and hypertensive rats with experimental hemiparkinsonism. Neuropharmacology. 2009; 56(3):573-579.

¹²²Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹²³Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹²⁴Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Duran R, Luna Jde D, Segarra AB, Hermoso F, Ramírez M. Asymmetrical response of aminopeptidase A and nitric oxide in plasma of normotensive and hypertensive rats with experimental hemiparkinsonism. Neuropharmacology. 2009; 56(3):573-579.

¹²⁵Segarra AB, Ramirez M, Banegas I, Alba F, Vives F, Gasparo Md, Ortega E, Ruiz E, Prieto I. Dietary fat influences testosterone, cholesterol, aminopeptidase A, and blood pressure in male rats. Horm Metab Res. 2008; 40(4):289-291.

Las concentraciones de leptina y grelina en plasma también se determinaron^{126, 127}.

4.1.2. Biodiversidad bacteriana

La comunidad bacteriana fecal se estudió mediante pirosecuenciación del ARNm 16S metagenómico amplificado como ya se describió para tres de las dietas¹²⁸. Los ácidos nucleicos se purificaron usando QIAamp® DNA Stool Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) y secuenciación realizada en Lifesequencing (Valencia, España) usando tecnología de pirosecuenciación Roche GS-FLX-Titanium + 454, dirigida al ADN ribosómico 16S Región V3 ± V4 (V3fwd: 5' TCCGTCAATTYMTTTRAGT 3', V4rev: 5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3'). El ciclo térmico consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos, y elongación a 72°C durante 5 minutos, según el método anteriormente descrito¹²⁹. Se construyeron 26 bibliotecas, las diferentes amplificaciones se midieron individualmente y se estimó la cantidad de ADN amplificado usando Quant-iT™ PicoGreen (Invitrogen). Las 26 muestras amplificadas se agruparon en un solo grupo equimolar que se utilizó en el paso de secuenciación. Se aplicó un filtro de calidad a las secuencias para eliminar aquellas con mala calidad. Las bases en posiciones extremas que no tenían Phred de Q20 o mayor se eliminaron, y más tarde, las secuencias cuya media de calidad no alcanzó el umbral Q20 también fueron eliminadas.

¹²⁶Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹²⁷Liu MY, Xydakis AM, Hoogeveen RC, Jones PH, Smith EO, Nelson KW, Ballantyne CM. Multiplexed analysis of biomarkers related to obesity and the metabolic syndrome in human plasma, using the Luminex-100 system. Clin Chem. 2005; 51(7):1102-1109.

¹²⁸Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹²⁹Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

El resto de las secuencias obtenidas fueron recortadas para adaptadores y eliminación de cebadores de PCR, usando “cutadapt v. 1.4.1”, y agrupadas en secuencias de un mínimo de 300 bases de longitud. Todas las secuencias restantes se verificaron para quimeras usando el programa UCHIME v. 4.2.40., como también se han detallado antes¹³⁰.

Los niveles taxonómicos de las diferentes secuencias se asignaron a través del programa en línea “Ribosomal Database Project Classifier”. Se obtuvieron curvas de rarefacción para cada muestra y se analizaron los niveles taxonómicos para confirmar que habían alcanzado el *plato* y no se esperaba encontrar más grupos taxonómicos si se aumentaba la secuenciación.

4.1.3. Estudios estadísticos

Para el análisis estadístico, seguimos los procedimientos descritos anteriormente¹³¹. Las diferencias estadísticamente significativas en las distribuciones de las variables de interés según el tipo de dieta se comprobaron a un nivel del 5% de significación por ANOVA o test de Kruskal-Wallis, dependiendo de si los supuestos se cumplieron o no. Cuando se rechazó la hipótesis nula, las comparaciones por pares se realizaron mediante el test de Dunn con valores p ajustados por la corrección de Bonferroni. Además, para cada variable fisiológica considerada, se desarrollaron modelos de regresión lineal múltiple, utilizando como variables independientes aquellos que mostraron diferencias significativas en ANOVA o test de Kruskal-Wallis.

Los modelos de regresión fueron ajustados por regresión gradual y eliminación hacia atrás. El software estadístico utilizado fue SPSS 19 IBM (Armonk, NY, EE.UU.), R 3.4.4 (Auckland, Nueva Zelanda y Gretl 2018c (San Diego, CA, EE.UU.).

¹³⁰Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹³¹Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

4.2. Objetivo 3

4.2.1. Animales

En este trabajo se utilizaron ratones Swiss Western de seis semanas de edad que fueron alimentados durante tres meses con una dieta estándar (ST), y otras tres dietas suplementadas en un 20% con AOVE, AOR o M¹³².

Tras las doce semanas de dietas, los animales fueron sacrificados como se ha explicado previamente y los intestinos gruesos se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

4.2.2. Biodiversidad bacteriana

Al inicio, a las seis semanas y al final del experimento se extrajo el ADN de las heces y se llevó a cabo la secuenciación masiva (Lifesequencing, Roche GS-FLX-Titanium + 454) de las regiones V3-V5 del gen del ARNr 16S, tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

De los datos obtenidos, seleccionamos aquellos correspondientes a las familias bacterianas del ácido láctico.

4.2.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico por ANOVA mediante el programa Statgrhaphics.

¹³²Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut Microbiota. Comparison to butter. Food Res Int. 2014; 64:553-559.

4.2.4. Aislamiento de cepas de bacterias lácticas procedentes de intestino grueso de ratones alimentados con una dieta alta en aceite de oliva virgen extra.

Para este trabajo, utilizamos las muestras congeladas previamente de intestino grueso de ratones que habían estado sometidos a una dieta enriquecida con AOVE durante 12 semanas. Se aislaron cepas de dos ratones de este grupo (animales 2OV y 8OV). Para ello se homogeneizó en solución salina al 0,85% estéril una porción de 2 cm de intestino grueso, previamente diseccionado y abierto, que se sembró en medio MBA en anaerobiosis a una temperatura de 37°C durante 3-4 días. De aquí, se aislaron en torno a 65 colonias de aspecto similar.

4.2.5. Identificación preliminar de las cepas

Tras el aislamiento de las colonias en medio selectivo y atmósfera anaeróbica, se realizó una tinción de Gram de todas ellas, descartándose las Gram negativas y guardando las Gram positivas con morfología bacilar o coccobacilar. Del total de cepas aisladas, se redujo la colección a 11 cepas, todas ellas procedentes del animal 8OV.

4.2.6. Pruebas bioquímicas

Una vez aisladas las 11 cepas, se procedió a una serie de pruebas bioquímicas para poder determinar sus características:

Se detectaron las enzimas degradadoras de almidón mediante el crecimiento en medio Agar Almidón. Se procedió mediante el método de siembra en estrías y posterior incubación a 30°C durante de 24 horas. Para su identificación, se añadió lugol (solución yodada), para determinar el halo característico de estas bacterias.

Para determinar las proteínas lácteas se utilizó medio de cultivo Agar Leche, una base, en que las bacterias producen ácido láctico, por degradación de componentes del medio, formando un halo transparente de identificación. Se procedió mediante el método de siembra en estrías y posterior incubación a 30°C durante 24 horas.

Se llevó a cabo el crecimiento en medio para halotolerantes (MRS agar + NaCl 6,5%). La presencia de la peptona, glucosa, manganeso y magnesio en este medio, aportaron los componentes nutritivos y energéticos para el crecimiento de *Lactobacillus*. Se distribuyeron de 2 a 5 ml en tubos de ensayo.

Posteriormente, se procedió mediante inoculación y se incubaron las muestras en atmósfera al 5% de anhídrido carbónico a 30°C durante 5 días. La presencia de bacterias lácticas, se determinó mediante la aparición de turbidez del medio de cultivo.

Para determinar la producción de gases se utilizó medio de cultivo MRS con campana de Durham. Se realizó una inoculación y posterior incubación en atmósfera al 5% de anhídrido carbónico a 30°C durante 5 días. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la presencia de turbidez, y el desarrollo de burbujas de gas en campanita Durham, incorporadas en el tubo de ensayo.

Se realizó crecimiento selectivo en medio KAA (de Scharlau) para confirmar la existencia de *Enterococcus*. Se sembraron 100 µl de muestra en cada placa y posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas. La kanamicina sulfato y la azida sódica inhiben el crecimiento de bacterias no enterocócicas. La identificación positiva se observó como resultado de una coloración variable de verde a negro en el medio, debido a que los *Enterococcus* hidrolizan la esculina produciendo glucosa y esculetina, la cual reacciona con el amonio de hierro (III), lo que produce esta coloración.

4.2.7. Producción de bacteriocinas

Se realizó un estudio de la producción de proteínas con actividad antimicrobiana. Para ello se siguió el protocolo de Schillinger y Lucke, 1989¹³³. Se usó como medio base MRS tamponado con sobrecapa de BHI tamponado con sales (di-Sodio hidrógeno Fosfato anhidro y Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato), donde creció una cepa de *Staphylococcus aureus* como bacteria indicadora. También se estudió la producción de bacteriocinas en medios no tamponados para comprobar la inhibición del crecimiento de la indicadora por la producción de ácidos.

¹³³Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol. 1989; 55(8):1901-1906.

Se preparó medio BHA para las placas de siembra. Una vez hecho esto, se sembraron 5 µL de 7 cepas de *Enterococcus sp.* diferentes (contenidas en tubos con medio BHA) en cada placa. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 24 horas hasta observar que las bacterias habían crecido correctamente. Al mismo tiempo, se hizo crecer en un tubo de BHI de 5 ml, la bacteria indicadora.

Las placas con los enterococos y el tubo de BHI con la indicadora fueron puestas en contacto con las cepas productoras de bacteriocinas por sobrecapa (también tamponada) de crecimiento.

Los patógenos indicadores que se utilizaron para las sobrecapas fueron *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Se añadieron 50 µL de cada patógeno a tubos para sobrecapas atemperados a 55°C. Tras agitar en vórtex, los tubos fueron vertidos sobre cada placa de BHA con las cepas productoras de bacteriocinas.

Los resultados se observaron comprobando si existía halo de inhibición para cada caso.

4.2.8. Presencia de genes para aminas biógenas

Se realizó un estudio a nivel genético de la presencia de genes involucrados en la producción de aminas biógenas: Histamina (hdc), Tirosina (tdc) y Ornitina (odc)^{134, 135, 136}.

Para ello se realizó un estudio mediante PCR de la presencia de los mismos en las muestras.

¹³⁴Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Characterization and safety evaluation of *enterococci* isolated from Spanish goats' milk cheeses. Int J Food Microbiol. 2009; 132(1):24-32.

¹³⁵Perin LM, Miranda RO, Todorov SD, Franco BD, Nero LA. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic *lactococci* and *enterococci* isolated from goat milk. Int J Food Microbiol. 2014; 185:121-126.

¹³⁶Cebrián R, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. Food Microbiol. 2012; 30(1):59-67.

La mezcla que se utilizó para la PCR de las tres aminos contenía:

- 2 µl de muestra de ADN,
- 28,8 µl de agua milliQ,
- 6 µl de dNTPs,
- 5 µl de tampón,
- 3 µl de MgCl₂,
- 2,5 µl cebador f,
- 2,5 µl cebador r,
- 0,2 µl taq polimerasa.

Para la amina histamina (hdc), se llevaron a cabo dos PCRs. Para la PCR hdc1, se utilizaron los cebadores hdc1-f: AGATGGTATTGTTTCTTATG y hdc1-r: AGACCATACACCATAACCTT. El programa utilizado consistió en 1 minuto inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, y 1 minuto final a 72°C. El tamaño del amplicón resultante fue de 367 bp.

Para la PCR hdc2, se emplearon los cebadores hdc2-f: AAYTCNTTYGAYTTYGARAARGARG y hdc2-r: ATNGGNGANCCDATCATYTTTRTGNC. El programa consistió en 1 minuto inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C, y 1 minuto final a 72°C. El tamaño del amplicón resultante fue de 534 bp.

En el caso de la tirosina (tdc), los cebadores empleados fueron tdc-f: GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCARG y tdc-r: CCRTARTCNGGNATAGCRAARTCNGTRTG. El programa consistió en 1 minuto inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C y 1 minuto a 71°C, y 1 minuto final a 71°C. El tamaño del amplicón resultante fue de 924 bp.

La tercera amina, la ornitina (odc) se estudió mediante el uso de los cebadores odc-f: GTNTTYAAYGCNGAYAARCANTAYTTYGT y odc-r: AATNGARTTNAGTTCRCAYTTYTCNGG. El programa consistió en 1 minuto inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C y 1 minuto a 71°C, y 1 minuto final a 71°C. El tamaño del amplicón resultante fue de 1446 bp.

4.2.9. Secuenciación de cepas

Para la determinación de las especies se realizó una secuenciación de la región conservada 16S de todas las cepas, tras amplificarla mediante PCR específica de especie.

En primer lugar, se realizó la extracción de ADN de las muestras. Este procedimiento se realizó con el kit denominado Illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit. Para realizar una extracción de ADN adecuada, antes de usar el kit se realizó una prelisis con TELS y mutanolisina, y se mantuvo en la estufa incubando durante 45 minutos a 37°C, agitando las muestras adecuadamente cada 10 minutos. A continuación, se siguieron los pasos del protocolo del kit. Finalmente, las muestras se conservaron en Eppendorfs de 1,5 ml a -80°C.

Para realizar la secuenciación de las muestras, se realizó una PCR previa, utilizando como cebadores el 16S: AGAGTTTGATCMTGGCTC y el 23S: CNGGTCCTTCATCGCCT. La mezcla de la reacción consistió en:

- 4 µl de muestra de ADN a una concentración inicial de 10 ng/µl,
- 57,7 µl de agua milliQ,
- 12 µl de dNTPs,
- 10 µl de tampón,
- 6 µl de MgCl₂,
- 5 µl cebador 16S,
- 5 µl cebador 23S,
- 0,5 µl taq polimerasa.

El programa empleado consistió en 4 minutos iniciales a 96°C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 30 segundos a 52°C y 2 minutos a 72°C, y 4 minutos finales a 72°C. El tamaño del amplicón osciló entre 1200-1400 pb.

Finalmente, se comparó la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos, para lo cual se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

4.2.10. Detección de posibles metanógenas en intestino grueso de ratón mediante microscopía confocal de fluorescencia. Comparación entre varias dietas altas en grasa.

En este caso, visualizamos en el microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP5 II, a 405 nm, del Centro de Instrumentación Científico-Técnica, muestras de mucosa de intestino grueso pertenecientes a cada uno de los ratones utilizados, de manera que se detectó la presencia de microorganismos metanógenos en todas las muestras observadas, realizándose un total de cinco imágenes en cinco áreas diferentes para cada muestra, en las esquinas y centro de los campos.

Una vez obtenidas las imágenes correspondientes a cada muestra, se procedió al conteo de arqueas metanógenas con la ayuda del software informático Image J, y posteriormente se trataron los datos obtenidos en una hoja de cálculo con formato “Excel”, a los que se añadieron también los datos anteriores analizándose por separado y en conjunto.

Como control positivo se utilizaron muestras obtenidas del digestor anaeróbico de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Jaén. Como control negativo se utilizó un cóctel de cepas intestinales no metanogénicas obtenidas de nuestra colección: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella entérica* y *Escherichia coli*, todas ellas obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España.

4.3. Objetivo 4

4.3.1. Cepas bacterianas

Para este trabajo se utilizaron un total de 131 cepas de enterococos de la colección del grupo de investigación PAIDI AGR230 de la Universidad de Jaén que habían sido aisladas de alimentos y del medio ambiente.

4.3.2. Ensayo de tolerancia al aceite de oliva con ácido cólico

150 ml de cultivo bacteriano se sembraron en medio BHA (Scharlab). Sobre la siembra se colocaron, en condiciones axénicas, gotas de 5 µl de emulsión de ácido cólico, al 1% en agua, con AOR o AOVE, en proporción 1:1, así como gotas 5 µl de ácido cólico al 1% como control, tras lo cual las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

4.3.3. Ensayo de tolerancia al aceite de oliva con lecitina

Se sembraron 150 ml de cultivo bacteriano en medio BHA (Scharlab) y sobre la siembra se colocaron, en condiciones axénicas, gotas de 5 µl de emulsión de lecitina al 3% con AOR o AOVE, en proporción 1:1, así como gotas 5 µl de lecitina al 3% como control, tras lo cual las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. A las 24 horas se evaluó el crecimiento microbiano en las placas.

4.3.4. Ensayo de tolerancia al aceite de oliva con papel de filtro

En el ensayo con papel de filtro, se utilizaron 150 ml de cultivo bacteriano que se sembraron en medio BHA (Scharlab). La siembra se puso en contacto en condiciones axénicas con 2 cm² de papel de filtro empapado en solución salina, AOR o AOVE, tras lo cual se incubó durante 24 horas a 37°C.

5. RESULTADOS

5.1. Objetivos 1 y 2

- Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019 Feb 23;7(2). pii: E61.
- Capítulo de libro “Efecto del aceite de oliva refinado sobre la microbiota intestinal de ratones y su relación con diferentes variables fisiológicas. Comparación con el oliva virgen extra” en EXPOLIVA 19; Comunicaciones presentadas al XIX simposio científico técnico, ISBN 978-84-946839-2-3.



Article

Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables

Nieves Martínez ¹, Isabel Prieto ² , Marina Hidalgo ¹, Ana Belén Segarra ² , Ana M. Martínez-Rodríguez ³ , Antonio Cobo ¹, Manuel Ramírez ², Antonio Gálvez ¹ and Magdalena Martínez-Cañamero ^{1,*}

¹ Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Paraje de Las Lagunillas s/n, Jaén 23072, Spain; mnm0001@red.ujaen.es (N.M.); mhidalgo@ujaen.es (M.H.); acmolino@ujaen.es (A.C.); agalvez@ujaen.es (A.G.)

² Área de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Paraje de Las Lagunillas s/n, Jaén 23072, Spain; iprieto@ujaen.es (I.P.); asegarra@ujaen.es (A.B.S.); msanchez@ujaen.es (M.R.)

³ Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Jaén, Paraje de Las Lagunillas s/n, Jaén 23072, Spain; ammartin@ujaen.es

* Correspondence: canamero@ujaen.es; Tel.: +34-953-212701

Received: 27 January 2019; Accepted: 20 February 2019; Published: 23 February 2019



Abstract: Extra virgin olive oil (EVOO) has been reported to have a distinct influence on gut microbiota in comparison to other fats, with its physiological benefits widely studied. However, a large proportion of the population consumes olive oil after a depurative process that not only mellows its taste, but also deprives it of polyphenols and other minority components. In this study, we compare the influence on the intestinal microbiota of a diet high in this refined olive oil (ROO) with other fat-enriched diets. Swiss Webster mice were fed standard or a high-fat diet enriched with EVOO, ROO, or butter (BT). Physiological parameters were also evaluated. At the end of the feeding period, DNA was extracted from feces and the 16S rRNA was pyrosequenced. The group fed ROO behaved differently to the EVOO group in half the families with statistically significant differences among the diets, with higher comparative levels in three families—Desulfovibrionaceae, Spiroplasmataceae, and Helicobacteraceae—correlating with total cholesterol. These results are again indicative of a link between specific diets, certain physiological parameters and the prevalence of some taxa, but also support the possibility that polyphenols and minor components of EVOO are involved in some of the proposed effects of this fat through the modulation of the intestinal microbiota

Keywords: olive oil; polyphenols; butter; next generation sequencing; gut microbiota

1. Introduction

The negative effects of high-fat diets (HFD) on health, mainly favoring the condition known as metabolic syndrome and the worsening of several cardiovascular variables, have long been known [1]. However, it has been only in the last ten years that the effect of the diet on the prevalent microbial taxa that dwell in the intestines [2], and the possible influence of an intestinal microbial misbalance or dysbiosis on animal physiology [3], have been widely acknowledged. Intestinal microorganisms have an essential role in the host homeostasis and a disturbed colonic microbial ecology can lead to numerous disorders of different kinds, not only digestive but also metabolic or even cognitive through the gut–brain axis. Therefore, gut microbiota has emerged as a new and important factor to be considered in the negative consequences of HFD [4].

Considering that intestinal microbiota is composed of a large number of bacterial cells, distributed in a high number of taxa with complex ecological relationships among them and with an increasingly more evident metabolic continuous communication with the host, it makes sense to think that changes in the microbiota might have a concomitant effect on the organism [5]. If the large intestine is viewed as a fermenter or a bioreactor, it also seems reasonable to consider that food and the type of diet may be the main or one of the main factors exerting an effect on the microbiota that thrives within. Therefore, when this diet presents certain physiological distinctions, it is not illogical to consider that these variations could be produced, at least in part, throughout the bacterial metabolism, being this step necessary for the physiological outcome. This assumption is especially rational when correlations between the biological traits and the bacterial presence are statistically significant and, hence, a link is proven to happen. However, correlation is not causation and the two variables can change concomitantly for different reasons. One variable can certainly affect the other or vice versa or it could just happen that both of them are equally affected by the specific diet, with no interaction at all between the microbial taxon and the physiological variable.

For years, nutritionists and researchers have claimed that the impact of lipids is dissimilar depending on their degree of saturation [6,7] and, hence, this different effect has concomitant outcomes as well on the microbiota profile [8]. In particular, monounsaturated fatty acids are considered to be particularly healthy [9], and among them, olive oil has been widely studied because of its prevalent role in the Mediterranean Diet and its appreciated sensorial characteristics [10]. The specific effect of olive oil on intestinal microbiota was consequently highly interesting and the study was undertaken by our laboratory using, first, denaturing gradient gel electrophoresis [11] and, recently, using a 16S ribosomal DNA metagenomic approach [12] as explained further below in this section.

Virgin olive oil is also enriched in some minority components, such as polyphenols, which are well known for their antimicrobial activity on certain bacteria [13] as well as for their anti-inflammatory and antioxidant effects [14]. Because of this behavior, the specific influence of polyphenols on the intestinal microbiota has similarly been studied in several foodstuffs [15,16]. However, not all commercial olive oils have the intact polyphenol content. Virgin olive oil is extracted mechanically from olives with no chemical intervention and contains relatively high amounts of phenolic compounds and tocopherols. In contrast, if the acidity of the virgin oil is too high; it may undergo a chemical treatment to improve this condition and it is then transformed in refined olive oil (ROO). ROO has the same fatty acid composition as the virgin oil from which it is derived but it loses most of the minority components in the process as well as the palatability and the bouquet [17]. This is why it is commercialized only after 10–15% of virgin olive oil has been added, which improves its organoleptic properties. In fact, virgin olive oil has an average polyphenol content of 150–400 mg/kg while refined olive oil has only a residual presence (0–5 mg/kg) [18]. The loss of the unsaponifiable matter is important since it could change some of the healthy properties attributed to virgin olive oil. This importance is magnified by the fact that the commercialization of ROO is significant since, according to the local Ministry of Agriculture [19], there was 60% consumption of this fat versus 40% consumption of virgin and extra virgin olive oils during 2016 in Spain, the main olive oil producer and one of the leading consumers of this fat in the World. Moreover, ROO is preferred by American consumers over some virgin olive oils, probably because of its milder flavor, according to a recent inquiry [20].

In spite of all these facts, few scientific studies have focused on the influence of ROO on health [17,21] and none of them have studied its effect on the intestinal microbiota. Aware of this, we included commercial ROO in the above mentioned analysis [11]. In that report ROO showed different behavior to EVOO and a distinctive microbial profile using denaturing gradient gel electrophoresis. However, microbial taxa were not thoroughly studied, neither was the physiological effect on the host. Recently, using a 16S ribosomal DNA metagenomic approach we compared a standard diet (SD) and two high-fat diets enriched in butter (BT) and extra virgin olive oil (EVOO), respectively [12]. The results obtained showed clear differences both in the fecal microbiota profile and in several physiological variables related to metabolic syndrome. Some of these variables held statistically

significant correlations with the percentages of several taxa that increased in the butter-enriched diet but not in the one with EVOO. As ROO was not included then, in the present study we have extended the previous report by incorporating a diet enriched in commercial ROO in order to elucidate differences in microbial taxa between this and the other diets and to look for possible correlations with physiological variables in the host. The results obtained can not only add new data to the influence of ROO on health but also on the specific role of polyphenols on the effect exerted by virgin olive oil.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Experimental procedures were followed as already described for three of the four diets in reference [12] (SD, standard chow diet; high-fat diets: EVOO, standard chow enriched in virgin olive oil, and BT, standard chow enriched in butter, until reaching 35% of total energy in both cases). In this work, a fourth experimental group fed with ROO diet was also added, consisting of standard chow enriched in refined olive oil until reaching 35% of total energy. As in Prieto et al. [12], standard Panlab A04 chow was used but this time it was supplemented with 20% refined olive oil instead of virgin olive oil or butter. Table 1 shows the composition of the four diets. Briefly, we fed ad libitum 8 male Swiss Webster mice with SD diet, and 9 mice with EVOO, BT, and ROO diets, respectively, making a total of 35 mice, during a 12-week period.

Table 1. Nutrient composition and energy content of standard (SD) and high-fat diets enriched with extra virgin olive oil (EVOO), refined olive oil (ROO) and butter (BT).

Diet.	SD		EVOO		ROO		BT	
Composition	g/100 g	% energy	g/100 g	% energy	g/100 g	% energy	g/100 g	% energy
Protein	16.5	20	16.5	14	16.5	14	16.5	14
Carbohydrates	60	72	55	48	55	48	55	48
Fat	3	8	20	35	20	35	20	35
Total Energy (kJ/g)	14.2		19.6		19.6		19.6	

EVOO and butter were obtained and characterized as indicated [12]. ROO was obtained from a large commercial store (Hacendado, Mercadona, Jaén; 76.6% MUFA, 7.1% PUFA, 16.3% SFA). All experimental procedures were reviewed and approved by the Bioethics Committee of the University of Jaén in accordance with 86/609/EEC, initially on 29 December 2010 for project AGR 6340 and extended for project PP2015/08/09. The procedure was followed as described previously [12]. Mice were housed at constant temperature (23 °C), constant humidity (50%), and with a constant day length (12 h) and, twenty-four hours before sacrifice, they were individually placed in metabolic cages so that food intake, water intake, diuresis, body weight (BW), and systolic blood pressure (SBP) could be determined for each animal. After twelve weeks, feces from each mouse were also saved individually right after deposition and total DNA was extracted immediately as indicated below or kept at −80 °C until use. SBP was monitored as previously described [12,22]. At the end of the twelve-week period and after collecting all data (food and water intake, diuresis, body weight and SBP) and feces, animals were anesthetized, and blood samples were obtained through the left cardiac ventricle. Finally they were sacrificed by perfusing them through the same ventricle with saline solution [12]. Insulin, fasting glucose, triglycerides, total cholesterol, and HDL were measured as previously reported [12,22,23]. Leptin and ghrelin concentrations in plasma were also determined as previously reported [12,24].

2.2. Bacterial Biodiversity

Fecal bacterial community was studied by pyrosequencing the amplified metagenomic 16S rRNA as already described for three of the diets [12]. Nucleic acids were purified using QIAamp® DNA Stool Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and sequencing was performed at Lifesequencing (Valencia, Spain) as

described [12] after thirty-five libraries were constructed. Quality control (Q20 threshold) and check for quimeras (UCHIME v. 4.2.40 program, Tiburon, CA, USA) have also been detailed before [12]. Taxonomic levels were assigned through the Ribosomal Database Project Classifier.

2.3. Statistical Studies

For the statistical analysis, we followed the procedures described previously [12]. Statistical significant differences in the distributions of the variables of interest according to the type of diet were tested at a 5% of signification by ANOVA or Kruskal–Wallis test depending on whether the assumptions were met or not. When the null hypothesis was rejected, pairwise comparisons were performed by Dunn test with *p*-values adjusted by Bonferroni correction. In addition, for each physiological variable under consideration, multiple lineal regression models were developed using as independent variables those that showed significant differences in ANOVA or Kruskal–Wallis test. The regression models were fitted by stepwise regression and backward elimination. The statistical software used was SPSS 19 IBM (Armonk, NY, USA), R 3.4.4 (Auckland, New Zealand, and Gretl 2018c (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Physiological Parameters

At the end of the experimental period, different physiological variables were measured. Raw data corresponding to BT, EVOO, and SD were previously reported in Prieto et al. (2018) [12]. In the present work, we found that BT-enriched diet produced the highest statistically significant body weight ($p < 0.05$) and SBP levels ($p < 0.01$) of all four diets, as well as the highest plasma insulin levels, which were also significant versus EVOO- and ROO-enriched diet values ($p < 0.05$) (Table 2). Mice fed SD had the lowest statistically significant total cholesterol levels in plasma ($p < 0.01$) and EVOO fed mice had the second lowest levels, being significant versus the values found in the ROO group ($p < 0.01$). It is worth mentioning that there is no cholesterol present either in EVOO or ROO in opposition to BT, where it can be found at about 215 mg/100 g. EVOO also triggered the highest HDL/LDL ratio, being significant versus SD values ($p < 0.05$) as already reported [12], ROO produced the second lowest values but with no statistical significance (Table 2). No significant differences were found in food or water intake, diuresis, and plasma leptin, ghrelin or triglycerides.

Table 2. Metabolic and physiological values in mice at the end of the experiment.

Diet	SD	EVOO	BT	ROO	p
Food Intake (g/day)	3.70 ± 0.65	3.74 ± 0.39	2.76 ± 0.38	3.83 ± 0.41	n.s.
Water intake (mL/day)	8.71 ± 1.61	11.28 ± 1.60	6.67 ± 1.95	7.14 ± 1.10	n.s.
Diuresis (mL/day)	2.44 ± 0.70	2.68 ± 0.65	1.65 ± 0.63	2.41 ± 0.50	n.s.
Body Weight (g)	39.09 ± 1.17	38.62 ± 0.71	42.15 ± 0.61	38.09 ± 0.86	A *
SBP (mmHg)	161.71 ± 11.83	148.11 ± 5.94	190.50 ± 8.53	156.14 ± 19.54	A **
Plasma Leptin (pg/mL)	1929.63 ± 437.86	949.89 ± 230.36	1433.23 ± 226.95	897.33 ± 259.13	n.s.
Plasma Ghrelin (pg/mL)	55.0 ± 17.56	94.3 ± 62.36	78.02 ± 42.82	89.33 ± 14.97	n.s.
Plasma Insulin (mg/100 mL)	1253.28 ± 201.32	685.71 ± 139.57	1518.44 ± 329.97	875.97 ± 132.60	B *
Plasma Glucose (mg/100 mL)	194.13 ± 17.31	175.33 ± 18.95	192.0 ± 17.2	259.63 ± 20.50	C *
Plasma Triglycerides (mg/100 mL)	39.11 ± 11.88	26.01 ± 3.77	48.94 ± 4.89	47.44 ± 8.89	n.s.
Plasma Total Cholesterol (mg/100mL)	49.28 ± 10.53	84.57 ± 9.98	98.67 ± 9.98	115.4 ± 11.39	D **
Plasma HDL/LDL Ratio	0.20 ± 0.02	0.38 ± 0.08	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.02	E *

Given values are mean ± SEM. Standard, EVOO, and BT diet values from [12]. n.s.: not significant; A: differences in BT vs. standard, ROO, and EVOO diets; B: differences in BT vs. EVOO, and ROO diets; C: differences in ROO vs. BT, standard, and EVOO diets; D: differences in standard vs. EVOO, ROO, and BT diets, and EVOO vs. ROO diet; E: differences in standard vs. EVOO diet; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.2. Sequencing, Taxa Adscription, Percentage Comparison, and Correlations

A total amount of 264.97 MB from the 35 fecal samples were sequenced, once reads were finally stabilized. Sequences were trimmed and filtered, leaving a final sum of 393958 (540–555 nt of mean length). After performing the blast search, reads were grouped in taxa according to different taxonomical levels, with a final output of 10 phyla, 82 families, 223 genera, and 513 species.

For clarity, Figure 1 shows only the seven most representative phyla. These are complemented with the phyla Synergistetes, Verrucomicrobia, and Deinococcus-Thermus that are present in a very low proportion in one single mouse under SD in the first case and under the ROO diet in the other two. After analyzing the distributions using Kruskal–Wallis test, only the phylum Tenericutes showed statistically significant differences ($p = 0.023$), with a pairwise comparison rendering adjusted signification only between the standard and ROO groups ($p = 0.013$; Figure 2). When a regression fit was performed, Tenericutes showed positive correlation with total cholesterol ($R^2 = 0.12$; $p = 0.041$) and diuresis ($R^2 = 0.40$; $p = 0.030$).

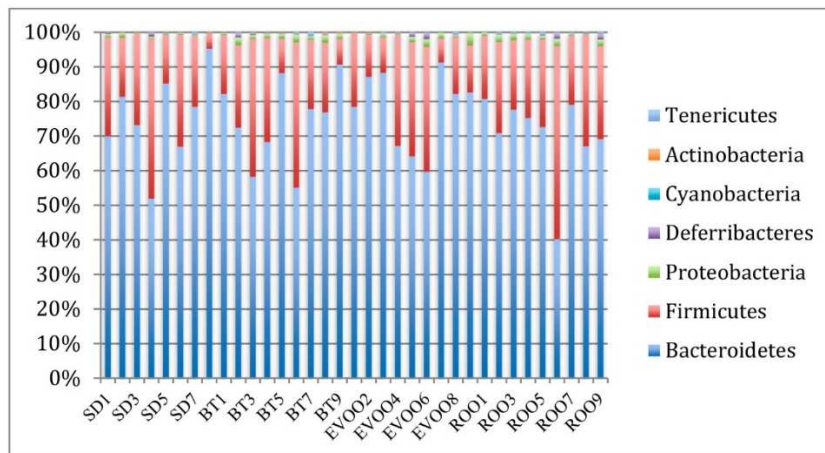


Figure 1. Bacterial distribution, in sequence percentage, at the level of phylum. Each column represents the bacterial fecal community from one mouse, grouped by diet. BT: butter diet; EVOO: extra virgin olive oil diet; ROO: refined olive oil diet; SD: standard chow. SD, EVOO, and BT diet values from Prieto et al. [12].

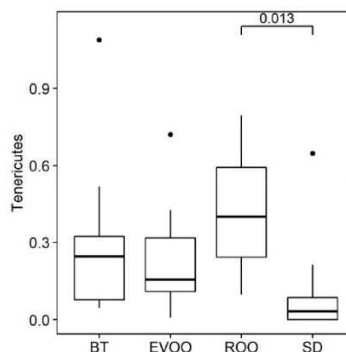


Figure 2. Box plots of presence of the phylum Tenericutes, in percentage of sequences, after feces DNA extraction from mice fed with the different diets. BT: butter diet; EVOO: extra virgin olive oil diet; ROO: refined olive oil diet; SD: standard chow. SD, EVOO, and BT diet values from Prieto et al. [12].

At the family level, ten taxa had statistically significant differences among the four groups after a Kruskal–Wallis analysis. Figure 3 shows the box plot diagrams of these families with the corresponding pairwise adjusted p -value in the significant cases. As it is shown, EVOO had statistical significant differences with SD in the percentage of Prevotellaceae, Erysipelotrichaceae, Sutterellaceae, and Christensenellaceae, while ROO had differences with ROO in Marinilabiliaceae and Spiroplasmataceae, and with BT in Staphylococcaceae. Additionally, the levels of Microbacteriaceae were significantly different between BT and each one of the three other diets.

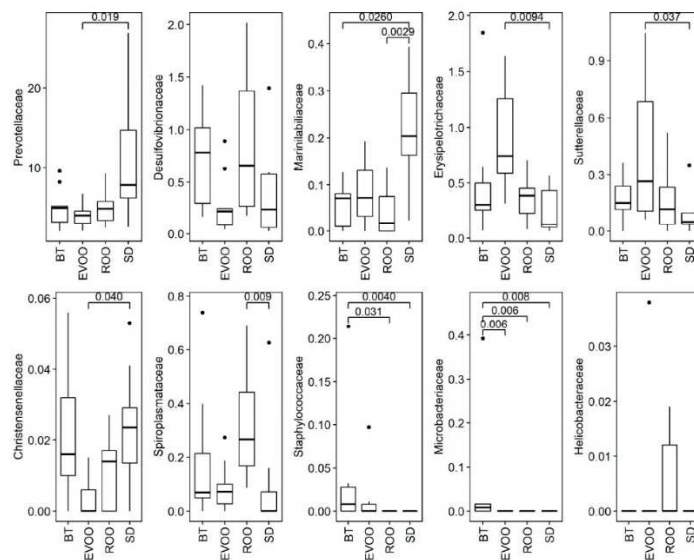


Figure 3. Box plots of presence of the ten families with significant differences ($p < 0.05$), in percentage of sequences, after feces DNA extraction from mice fed with the different diets. BT: butter diet; EVOO: extra virgin olive oil diet; ROO: refined olive oil diet; SD: standard chow. SD, EVOO and BT diet values from [12]. Significant pairwise comparisons adjusted p -values are also shown.

Different multiple linear regression models were fitted to explain each physiological variable, using as independent variables all the families with significant differences. Table 3 shows the results obtained. Only nine families are shown since Christensenellaceae did not retrieve any significant model.

Table 3. Regression analysis for the physiological variables studied and those families with statistical differences in total percentage.

Variable	Diuresis (0.23/0.0086)	Leptin (0.79/0.0000)	Insulin * (0.12/0.0456)	Total Cholesterol (0.23/0.0185)	Triglycerides (0.62/0.0000)
Prevotellaceae	n.s.	n.s.	n.s.	-2.73 ± 1.18 (0.0276)	n.s.
Desulfovibrionaceae	n.s.	-309.07 ± 78.84 (0.0006)	n.s.	n.s.	n.s.
Marinilabiliaceae	n.s.	-2112.02 ± 1004.75 (0.0462)	n.s.	n.s.	n.s.
Erysipelotrichaceae	1.55 ± 0.54 (0.0086)	n.s.	-0.461 ± 0.221 (0.0456)	n.s.	n.s.
Sutterellaceae	n.s.	-1026.14 ± 189.08 (0.0000)	n.s.	n.s.	n.s.
Spiroplasmataceae	n.s.	-5033.70 ± 2006.53 (0.0000)	n.s.	60.63 ± 28.27 (0.0399)	n.s.

Table 3. Cont.

Variable	Diuresis (0.23/0.0086)	Leptin (0.79/0.0000)	Insulin * (0.12/0.0456)	Total Cholesterol (0.23/0.0185)	Triglycerides (0.62/0.0000)
Staphylococcaceae	n.s.	-5033.70 ± 2006.53 (0.0193)	n.s.	n.s.	110.39 ± 19.70 (0.0000)
Microbacteriaceae	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	22.73 ± 8.61 (0.0130)
Helicobacteraceae	n.s.	-40363.4 ± 8870.42 (0.0001)	n.s.	n.s.	n.s.

For each case, regression coefficient estimate, s.e. and p -values are shown. R^2 and p -values of the model are also indicated under each physiological variable. * indicates that logarithms of data have been used for the analysis. n.s., not significant.

With respect to genera, a Kruskal–Wallis analysis indicated that fifteen of the 223 genera detected had statistically significant differences among the diets, as shown in Figure 4, where the corresponding pairwise adjusted p -value is also indicated in the significant cases. As specified, EVOO had statistical significant differences specifically with ROO in the percentage of *Desulfovibrio*; with SD in the percentage of *Fusicatenibacter*, *Parasutterella*, and *Marinilabilia*, and with BT in *Christensenella*. On the other hand, ROO had statistical significant differences with SD in *Ruminiclostridium*, *Marispirillum*, and *Spiroplasma*, and with BT in *Helicobacter*. Additionally, the three high-fat diets presented significant differences with SD in *Anaerophaga*, and BT had significant differences with the other three diets in *Curtobacterium*.

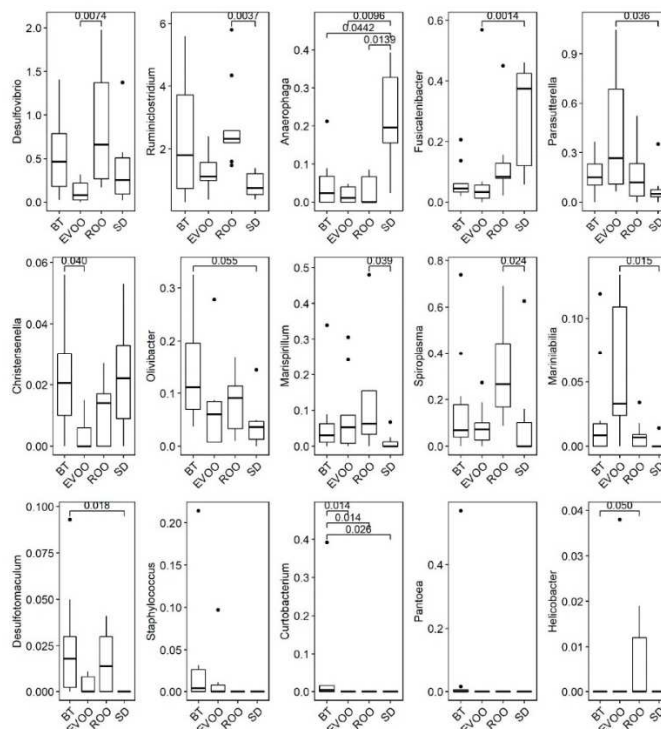


Figure 4. Box plots of presence of the fifteen genera with significant differences ($p < 0.05$), in percentage of sequences, after feces DNA extraction from mice fed with the different diets. BT: butter diet; EVOO: extra virgin olive oil diet; ROO: refined olive oil diet; SD: standard chow. SD, EVOO and BT diet values from [12]. Significant pairwise comparisons adjusted p -values are also shown.

Again, for each physiological variable a multiple linear regression was fitted considering as covariates the genera that show significant differences. A high colineation was found between the genera *Curtobacterium* and *Pantoea* and, therefore, the analysis was performed twice, each time with one of the two of them. The results, shown in Table 4, were exactly the same in both cases.

4. Discussion

The present results demonstrate that there are differences in the intestinal microbiota of mice fed different high-fat diets, including a diet enriched in refined olive oil, and show that these changes correlate with certain physiological variables.

Olive oil, the main fat in the Mediterranean diet, has long been considered to be healthy and its influence on the intestinal microbiota has recently been studied [11,12,25]. Moreover, correlations between the percentage of specific bacterial taxa and physiological variables related to the metabolic syndrome [12,26] have been reported. Considering the dissimilar composition of the unsaponifiable fraction of different olive oils, a comparison between virgin and refined olive oil can help us to understand the responsibility of polyphenols and other minority components on the beneficial effects of olive oil and the importance of intestinal microbiota on them.

In this work, we analyzed data obtained from mice fed a diet enriched in ROO in comparison with mice fed a diet enriched with EVOO or with BT or a standard chow diet. Differences in microbial percentages as well as in the host physiology and their correlations have been evaluated. After twelve weeks of diets, ten bacterial families showed significant statistical differences upon a Kruskal–Wallis test (Figure 3). In two of them (*Prevotellaceae* and *Marinillabiales*) there was a marked distinction between the standard diet and the three high-fat diets. In the case of *Prevotellaceae*, there was adjusted significance between the SD and EVOO groups (SD versus the other two fats nonadjusted significance was also <0.05 ; Table S1). This family is related to plant-rich diets with high intake of carbohydrates, fiber and vegetables [27] which fits with the high levels detected in SD, a grain-based chow, and with its significant inverse correlation with total plasmatic cholesterol, not present in this diet. Contrary to this, in another five families—*Desulfovibrionaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Sutterellaceae*, *Spiroplasmataceae*, and *Helicobacteraceae*—there were differences among the three high-fat diets. One of the most interesting ones was *Desulfovibrionaceae* where global comparisons are significant even though adjusted pairwise significance was not detected, but where EVOO–ROO nonadjusted significance showed a p -value below 0.05 (Table S1). As we have previously discussed [12] *Desulfovibrionaceae* are sulfate-reducing bacteria that could be sustained by butter sulfate sources, since chondroitin sulfate, a common dietary supplement of animal origin, has been shown to stimulate *Desulfovibrio* intestinal growth [28] and, in some instances, they have been related to high-fat diets derived from milk [12,29]. According to our own report [12], this could explain the high presence of this bacterial taxon in the BT fed group in opposition to the EVOO group, also a high-fat diet. However, the unexpected high levels found in ROO in the present study delimitates more this scenario. With no sulfates from animal origin, this family was expected to behave in ROO as it does in the EVOO diet, unless there was an alternative available source of sulfur compounds. Indeed, the extra virgin olive oil used in this work is from organic farming, with no additives pre- or postharvest, and therefore no external components, like sulfur compounds, are present. On the contrary, commercial refined olive oils are mixed stocks from different origins and different cultivation conditions and the presence of other compounds cannot be ruled out. In addition to this, the effect of polyphenols in the low *Desulfovibrionaceae* levels detected in EVOO cannot be discarded either. Another interesting result is related to the physiological correlations since *Desulfovibrio* presents a positive correlation with food intake, water intake, diuresis, and total cholesterol (Table 4).

Table 4. Regression analysis for the physiological variables studied and those genera with statistical differences in total percentage.

Genera	FI 0.34/0.0299	WI 0.64/0.0001	Diuresis 0.40/0.0027	BW 0.13/0.0414	SBP 0.21/0.0093	Leptin 0.45/0.0002	Insulin * 0.14/0.0296	Triglycerides * 0.14/0.0323	T-CHO 0.39/0.0018	HDL/LDL* 0.50/0.0009
<i>Desulfovibrio</i>	1.81 ± 0.57 (0.0034)	4.49 ± 1.35 (0.0028)	1.36 ± 0.46 (0.0075)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	48.34 ± 13.62 (0.0013)	n.s.
<i>Ruminiclostridium</i>	n.s.	−1.41 ± 0.48 (0.0074)	n.s.	n.s.	8.43 ± 3.02 (0.0093)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.13 ± 0.06 (0.0295)
<i>Fusicatenibacter</i>	n.s.	13.80 ± 4.05 (0.0023)	4.78 ± 1.63 (0.0074)	−6.34 ± 2.98 (0.0414)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	−142.93 ± 37.67 (0.0007)	−1.84 ± 0.45 (0.0004)
<i>Parasutterella</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	−0.94 ± 0.41 (0.0296)	n.s.	n.s.	−1.01 ± 0.29 (0.0020)
<i>Olivibacter</i>	−6.32 ± 2.78 (0.0310)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	2.80 ± 1.25 (0.0324)	n.s.	n.s.
<i>Marispirillum</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	−3.21 ± 0.89 (0.0012)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Spiroplasma</i>	−2.94 ± 1.18 (0.0189)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	−0.85 ± 0.39 (0.0394)
<i>Marinilabilia</i>	16.90 ± 7.08 (0.0239)	90.74 ± 17.52 (0.0000)	18.61 ± 8.01 (0.0293)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Desulfotomaculum</i>	−34.26 ± 14.03 (0.0212)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	−764.08 ± 346.92 (0.0355)	n.s.
<i>Helicobacter</i>	n.s.	200.22 ± 68.19 (0.0072)	81.99 ± 27.92 (0.0074)	n.s.	n.s.	−28.18 ± 12.44 (0.0314)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

For each case, regression coefficient estimate, s.e. and p values are shown. R^2 and p values of the model are also indicated under each physiological variable. * indicates that logarithms of data have been used for the analysis. FI, food intake; WI, water intake; T-CHO, total cholesterol; SBP, systolic blood pressure. n.s., not significant.

Spiroplasmataceae is another remarkable case (Figure 3), moreover because it belongs to phylum Tenericutes (Figure 2), also significantly incremented in the ROO group. This family shows significant pairwise differences between ROO and SD and nonadjusted significance between ROO and the other two high-fat diets (with EVOO $p < 0.05$ and with BT $p < 0.1$; Table S1). At genus level, several genera belonging to this family have been detected but only one, *Spiroplasma*, reaches significance (Figure 4). Spiroplasmataceae correlates highly with total cholesterol (Table 4), which makes sense because these bacteria require cholesterol for growth since they have it in their cell membranes but cannot synthesize it [30,31]. They also require different fatty acids: mainly palmitic acid but oleic acid can also promote growth [30]. The low levels detected in the EVOO group can be related to the statistically significant different levels of total cholesterol present in the two groups, but polyphenol content can also play an important role, since hydroxytyrosol and polyphenols have been described as important antimicrobials for Tenericutes [32,33]. In this case it seems that the increment in bacterial taxa does not produce the physiological change but it is the physiological change that produces the bacterial increment. However, nondetected additional effects of this bacterial increment cannot be discarded and therefore it is important to be aware of this trend.

There is another family with unexpected significant increments in the ROO group, Helicobacteraceae (Figure 3), conformed by a single genus also significant in this study, *Helicobacter* (Figure 4), and by a single species, most similar to *H. mastomyrinus*, a microaerophilic, upper gastrointestinal tract, enterohepatic species [34] as most of the species of this family are. Both family and genus are inversely correlated with leptin (Tables 3 and 4), and it is another result worth taking into consideration, where polyphenols seem to have again an important protective role.

The other two families with different distribution between the ROO and EVOO groups are Erysipelotrichaceae and Sutterellaceae where, in opposition to the other cases, the EVOO group shows the highest values (Figure 3). The first family correlates inversely with insulin and the second one, inversely with leptin (Table 3), although the main significant genus detected in this family also correlates inversely with insulin (Table 4). The link of the EVOO group with bacterial percentages correlating with low levels of insulin was a recurrent result also in our previous report [12] and, therefore, polyphenols are good candidates to play a role in this outcome.

Finally, two families are present in very low but significantly higher proportions in the BT group than the others: Staphylococcaceae and Microbacteriaceae (Figure 3). These two families are skin dwellers, able to easily survive in the environment and they are conformed in this study by several genera and species, and therefore we do not discard a mouse skin origin favored by the BT-enriched diet.

In addition to the above genera, there are six additional ones that present significant differences but whose superior taxa do not (Figure 4). These are three genera belonging to the order Clostridiales (*Ruminoclostridium*, *Fusicatenibacter*, and *Desulfotomaculum*), two Proteobacteria (*Marispirillum* and *Pantoea*), and one Bacteroidales (*Olivibacter*), none of them with adjusted significant differences between EVOO and ROO. It is worth noting the case of *Desulfotomaculum*—another sulfate-reducing bacteria that has a higher presence in BT and ROO—as *Desulfovibrio* does, although with a slight decrease in ROO with respect to BT that coincides with the loss of correlation with total cholesterol. With respect to the Proteobacteria genera, the five detected belong to the five described proteobacterial lineages (α , β , γ , δ , ϵ -Proteobacteria) and all of them are present in a higher proportion in one of the high-fat diets. This reinforces the hypothesis that relates this bacterial taxon with fats [12,35], and with LPS-induced metabolic endotoxemia [36]. However, it should be noted that in our present results and in the previous ones [12], EVOO-fed mice present higher percentages only in a β -Proteobacteria, *Parasutterella* (fam. Sutterellaceae), which does not show any of these outcomes, correlating with lower levels of leptin, insulin, and HDL/LDL.

As indicated previously, correlation is not causation and the fact of uncovering two variables that evolve in parallel does not automatically indicate that one is the cause of the other. In the case of the present report, a number of physiological variables have proven to modify their values in relation to

the presence of certain bacterial taxa but more work has to be done, mainly in controlled gnotobiotic mice models, to undoubtedly show the extend of the responsibility of the microbiota in those effects. The results here presented delimitate the scenario for these future experiments.

5. Conclusions

As a summary, we have detected five bacterial families with different percentages between virgin and refined olive oil fed mice. In three of these families (Desulfovibrionaceae, Spiroplasmataceae, and Helicobacteraceae) extra virgin olive oil polyphenols and/or other minority components could contribute to prevent undesirable bacteria from reaching the levels obtained in ROO diet. In another two families (Erysipelotrichaceae and Sutterellaceae), polyphenols may act indirectly to promote these families increment with outcomes that still remain to be completely elucidated. Another prevalent bacterial family, Prevotellaceae, does not seem to be affected by the unsaponifiable fraction, at least in an apparent manner, showing the same behavior in the three high-fat diets, independently of their composition. Finally, the detected specific increment of Spiroplasma and Helicobacter species in the ROO enriched diet should be further studied.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/2/61/s1>, Table S1: *p*-values of Kruskal–Wallis test, and pairwise comparisons of nonadjusted and adjusted *p*-values of the families with significant differences between diets in the percentage of sequences retrieved from fecal samples.

Author Contributions: Conceptualization, M.M.-C. and I.P.; Methodology, I.P., M.M.-C., M.R. and A.G.; Validation, I.P. and M.M.-C.; Investigation, N.M., M.H., A.B.S. and A.C.; Data Curation, A.M.M.-R.; Writing—Original Draft Preparation, M.M.-C.; Writing—Review & Editing, M.M.-C., A.M.M.-R. and I.P.; Resources, M.R. and A.G.; Supervision, M.M.-C., A.C. and I.P.; Project Administration, I.P. and M.M.-C.; Funding Acquisition, M.M.-C. and I.P.

Funding: This research was funded by University of Jaén, grant number PP2015/08/08 (to M.M.-C. and I.P.) and Junta de Andalucía, grant PI Excelencia_2010 AGR 6340 (to MMC).

Acknowledgments: Animals were tended in the Center for Production and Animal Experimentation (CPEA-University of Jaén). We thank Peter Cassidy for proofreading the manuscript. We acknowledge as well to Aceites Soler Romero and Javier Alcalá Torres for providing us with their extra virgin olive oil.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Riccardi, G.; Giacco, R.; Rivellese, A.A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* **2004**, *23*, 447–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *12*, 174–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Albenberg, L.G.; Wu, G.D. Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1564–1572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zhang, C.; Zhang, M.; Wang, S.; Han, R.; Cao, Y.; Hua, W. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J.* **2010**, *4*, 232–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sunkara, T.; Rawla, P.; Ofosu, A.; Gaduputi, V. Fecal microbiota transplant—A new frontier in inflammatory bowel disease. *J. Inflamm. Res.* **2018**, *11*, 321–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Diwan, V.; Brown, L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 372–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Huang, C.W.; Chien, Y.S.; Chen, Y.J.; Ajuwon, K.M.; Mersmann, H.M.; Ding, S.T. Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Fava, F.; Gitau, R.; Griffin, B.A.; Gibson, G.R.; Tuohy, K.M.; Lovegrove, J.A. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome ‘at-risk’ population. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 216–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Gillingham, L.G.; Harris-Janz, S.; Jones, P.J. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids* **2011**, *46*, 209–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Martínez-González, M.A.; Martín-Calvo, N. The major European dietary patterns and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2013**, *14*, 265–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hidalgo, M.; Prieto, I.; Abriouel, H.; Cobo, A.; Benomar, N.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 553–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Prieto, I.; Hidalgo, M.; Segarra, A.B.; Martínez-Rodríguez, A.M.; Cobo, A.; Ramírez, M.; Abriouel, H.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Influence of a diet enriched in virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Medina, E.; de Castro, A.; Romero, C.; Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4954–4961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Grossi, C.; Rigacci, S.; Ambrosini, S.; Dami, T.E.; Luccarini, I.; Traini, C.; Failli, P.; Berti, A.; Casamenti, F.; Stefani, M. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Anh , F.F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonn , S.; Matamoros, S.; Varin, T.V.; Garofalo, C.; Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **2015**, *64*, 872–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Roopchand, D.E.; Carmody, R.N.; Kuhn, P.; Moskal, K.; Rojas-Silva, P.; Turnbaugh, P.J.; Raskin, I. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes* **2015**, *64*, 2847–2858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ramírez-Tortosa, C.; López-Pedrosa, J.M.; Suarez, A.; Ros, E.; Mataix, J.; Gil, A. Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: The Spanish Nutrition Study. *Br. J. Nutr.* **1999**, *82*, 31–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gorzynyk-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappello, F.; Kuban-Jankowska, A.; Marino Gammazza, A.; Knap, N.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. *Informe del Consumo de Alimentación en España 2016*; Servicio de Publicaciones del MAPAMA: Madrid, Spain, 2017.
20. Vázquez-Ara ujo, L.; Adhikari, K.; Chambers, E.; Chambers, D.H.; Carbonell-Barrachina, A.A. Cross-cultural perception of six commercial olive oils: A study with Spanish and US consumers. *Food Sci. Technol. Int.* **2015**, *21*, 454–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Pacheco, Y.M.; López, S.; Bermúdez, B.; Abia, R.; Muriana, F.J. Extra-virgin vs. refined olive oil on postprandial hemostatic markers in healthy subjects. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 1421–1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Banegas, I.; Prieto, I.; Vives, F.; Alba, F.; de Gasparo, M.; Duran, R.; de Dios Luna, J.; Segarra, A.B.; Hermoso, F.; Ramírez, M. Asymmetrical response of aminopeptidase A and nitric oxide in plasma of normotensive and hypertensive rats with experimental hemiparkinsonism. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 573–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Segarra, A.B.; Ramírez, M.; Banegas, I.; Alba, F.; Vives, F.; de Gasparo, M.; Ortega, E.; Ruiz, E.; Prieto, I. Dietary fat influences testosterone, cholesterol, aminopeptidase A, and blood pressure in male rats. *Horm. Metab. Res.* **2008**, *40*, 289–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liu, M.Y.; Xydakis, A.M.; Hoogeveen, R.C.; Jones, P.H.; Smith, E.B.; Nelson, K.W.; Ballantyne, C.M. Multiplexed analysis of biomarkers related to obesity and the metabolic syndrome in human plasma, using the Luminex-100 system. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 1102–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Nocella, C.; Cammisotto, V.; Fianchini, L.; D'Amico, A.; Novo, M.; Castellani, V.; Stefanini, L.; Violi, F.; Carnevale, R. Extra virgin olive oil and cardiovascular diseases: Benefits for human health. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2018**, *18*, 4–13. [[PubMed](#)]
26. Hidalgo, M.; Prieto, I.; Abrioue, H.; Villarejo, A.B.; Ramírez, M.; Cobo, A.; Benomar, N.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2018**, *73*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Faith, J.J.; McNulty, N.P.; Rey, F.E.; Gordon, J.L. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science* **2011**, *333*, 101–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rey, F.E.; Gonzalez, M.D.; Cheng, J.; Wu, M.; Ahern, P.P.; Gordon, J.I. Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 582–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Devkota, S.; Chang, E.B. Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *J. Dig. Dis.* **2015**, *33*, 351–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Freeman, B.A.; Sissenstein, R.; McManus, T.T.; Woodward, J.E.; Lee, I.M.; Mudd, J.B. Lipid composition and lipid metabolism of *Spiroplasma citri*. *J. Bacteriol.* **1976**, *125*, 946–954. [[PubMed](#)]
31. Shirley, H.Y.; Hung, T.A.; Chen, R.F.; Whitcomb, J.G.; Tully, Y.X. *Spiroplasma culicicola* sp. nov. from the Salt Marsh Mosquito *Aedes sollicitans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1987**, *37*, 365–370.
32. Musetti, R.; Favali, M.A.; Pressacco, L. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* **2000**, *102*, 133–147. [[PubMed](#)]
33. Furneri, P.M.; Piperno, A.; Sajia, A.; Bisignano, G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2004**, *48*, 4892–4894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shen, Z.; Xu, S.; Dewhirst, F.E.; Paster, B.J.; Pena, J.A.; Modlin, I.M.; Kidd, M.; Fox, J.G. A novel enterohepatic *Helicobacter* species 'Helicobacter mastomyrinus' isolated from the liver and intestine of rodents. *Helicobacter* **2005**, *10*, 59–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hildebrandt, M.A.; Hoffmann, C.; Sherrill-Mix, S.A.; Keilbaugh, S.A.; Hamady, M.; Chen, Y.Y.; Knight, R.; Ahima, R.S.; Bushman, F.; Wu, G.D. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 1716–1724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1761–1772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Efecto del aceite de oliva refinado sobre la microbiota intestinal de ratones y su relación con diferentes variables fisiológicas. Comparación con el oliva virgen extra

Marina Hidalgo¹, Isabel Prieto², Nieves Martínez¹, Ana Belén Segarra², Ana M. Martínez-Rodríguez³, Antonio Cobo¹, Manuel Ramírez², Antonio Gálvez¹, Magdalena Martínez-Cañamero¹

Área de Microbiología¹, Área de Fisiología² – Dpto. Ciencias de la Salud y Dpto. Estadística e Investigación Operativa³, Universidad de Jaén. Jaén (España).

RESUMEN

Anteriormente hemos mostrado que el aceite de oliva virgen extra (AOVE) tiene una influencia distinta en la microbiota intestinal en comparación con otras grasas, con beneficios fisiológicos ampliamente estudiados. En este estudio, ampliamos esta investigación incluyendo la influencia sobre la microbiota intestinal de una dieta rica en aceite de oliva refinado. Ratones Swiss Webster se alimentaron con pienso estándar o con dietas altas en grasas enriquecidas con AOVE, ROO o mantequilla (BT) respectivamente. También se evaluaron diferentes parámetros fisiológicos. Al final del período de alimentación se extrajo ADN de heces y el gen del ARNr 16S fue pirosecuenciado. El grupo alimentado con ROO se comportó de manera diferente al grupo de AOVE en la mitad de las especies que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las dietas, con niveles comparativos más altos en tres de ellas, correlacionando con el colesterol total. Estos resultados son nuevamente indicativos de un vínculo entre dietas, ciertos parámetros fisiológicos y la prevalencia de algunos taxones bacterianos, pero también respaldan la posibilidad de que los polifenoles y componentes menores de AOVE estén involucrados en algunos de los efectos propuestos del aceite virgen en la modulación de la microbiota intestinal.

Palabras Clave: Aceite de Oliva, microbiota intestinal

INTRODUCCIÓN

Los efectos negativos de las dietas ricas en grasas en la salud, favoreciendo principalmente el síndrome metabólico y el empeoramiento de varias variables cardiovasculares, se conocen desde hace mucho tiempo [1]. Sin embargo, solo en los últimos diez años se ha admitido su efecto en los microorganismos que habitan los intestinos [2] y la posible influencia que un desequilibrio o disbiosis microbiana intestinal puede conllevar en la fisiología animal [3]. Los microorganismos intestinales tienen un papel esencial en la homeostasis del huésped y una ecología microbiana colónica perturbada puede llevar a numerosos trastornos de diferentes tipos, no solo digestivos sino también metabólicos o incluso cognitivos a través del eje cerebro-intestinal.

Durante años, se ha afirmado que el impacto de los lípidos es diferente dependiendo de su grado de saturación [4] y, por lo tanto, este efecto diferente tiene resultados concomitantes también en el perfil

de la microbiota [5]. En particular, los ácidos grasos monoinsaturados se consideran particularmente saludables [6] y, entre ellos, el aceite de oliva se ha estudiado ampliamente debido a su papel predominante en la dieta mediterránea y sus apreciadas características sensoriales [7]. El efecto específico del aceite de oliva virgen (EVOO) en la microbiota intestinal era, por tanto, muy interesante y su estudio fue realizado por nuestro laboratorio utilizando, en primer lugar, electroforesis en gel de gradiente desnaturante [8] y, más recientemente, secuenciando el gen del ADN ribosomal 16S en el metagenoma [9].

Sin embargo, pocos estudios científicos se han centrado en la influencia del aceite de oliva refinado (ROO) en la salud [10, 11] y ninguno de ellos ha estudiado su efecto sobre la microbiota intestinal. Conscientes de esto, incluimos un refinado comercial en el primer análisis mencionado [8]. En ese informe, ROO mostró un comportamiento diferente al AOVE y un perfil microbiano distintivo en electroforesis en gel de gradiente desnaturante. Sin embargo, los taxones microbianos no se estudiaron a fondo, ni el efecto fisiológico en el huésped. Recientemente, utilizando un enfoque metagenómico del ADN ribosomal 16S, comparamos una dieta estándar (SD) y dos dietas ricas en grasas, enriquecidas en mantequilla (BT) y aceite de oliva virgen extra (EVOO) respectivamente [9]. Los resultados obtenidos mostraron claras diferencias tanto en el perfil de microbiota fecal como en varias variables fisiológicas relacionadas con el síndrome metabólico. Algunas de estas variables mantuvieron correlaciones estadísticamente significativas con los porcentajes de varios taxones que aumentaron en la dieta enriquecida con mantequilla, pero no en la de EVOO.

Como no se incluyó ROO en ese momento, hemos ampliado el informe anterior incorporando una dieta enriquecida en aceite de oliva refinado comercial para dilucidar las diferencias en los taxones microbianos entre esta y las otras dietas y para buscar posibles correlaciones con variables fisiológicas en el huésped. Los resultados obtenidos con los taxones de mayor rango se han publicado recientemente [12] y en el presente estudio

1

informamos por primera vez sobre la diversidad de especies microbianas y su posible influencia en las variaciones detectadas en diferentes variables. Los resultados obtenidos pueden no solo agregar nuevos datos al efecto del ROO sobre la salud sino también, por comparación, en el papel específico de los polifenoles en los beneficios ejercidos por el aceite de oliva virgen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo como ya se ha descrito [9,12] (SD, dieta con pienso estándar. Dietas ricas en grasas: AOVE, pienso estándar enriquecido en aceite de oliva virgen; ROO, enriquecido en aceite de oliva refinado y BT, pienso estándar enriquecido en mantequilla, hasta alcanzar el 35% de la energía total en los tres casos). Brevemente, alimentamos *ad libitum* 8 ratones Swiss Webster machos con dieta SD, y 9 ratones con dietas EVOO, BT y ROO respectivamente, formando un total de 35 ratones, durante un periodo de 12 semanas. Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Jaén de acuerdo con la normativa 86/609/EEC. Los ratones se mantuvieron a temperatura constante (23 ° C), humedad constante (50%) y con una duración de día constante (12 h) y, veinticuatro horas antes del sacrificio, se colocaron individualmente en jaulas metabólicas para poder determinar la ingesta de alimentos y de agua, la diuresis, el peso corporal (PW) y la presión arterial sistólica (PAS) para cada animal. Al cabo de doce semanas, las heces de cada ratón también se guardaron individualmente y el ADN total se extrajo inmediatamente como se indica a continuación o se mantuvo a -80 ° C hasta su uso. SBP fue monitoreada como se describe anteriormente [9,12,13]. Al final del periodo de doce semanas y después de recoger todos los datos y heces, los animales se anestesiaron y se obtuvieron muestras de sangre a través del ventrículo cardíaco izquierdo. Finalmente, se sacrificaron perfundiéndolos a través del mismo ventrículo con solución salina [9]. Los niveles de insulina, glucosa en ayunas, triglicéridos, colesterol total y el ratio HDL/LDL se midieron como se informó anteriormente [9,12,13,14].

Biodiversidad bacteriana

La comunidad bacteriana fecal se estudió mediante pirosecuenciación del rRNA 16S metagenómico amplificado como ya se ha descrito [9,12]. El control de calidad (umbral Q20) y la comprobación de quimeras (programa UCHIME v. 4.2.40) también se han detallado antes [9,12].

Estudios estadísticos

Las diferencias estadísticamente significativas en las distribuciones de las variables de interés según el tipo de dieta se comprobaron a un nivel del 5% de significación mediante ANOVA o Kruskal-Wallis. Las comparaciones por pares se realizaron mediante la prueba de Dunn con los valores de p ajustados por la corrección de Bonferroni. Además, para cada variable fisiológica considerada, se desarrollaron modelos de regresión lineal múltiple. El software estadístico utilizado fue SPSS, R y Gretl.

RESULTADOS

A partir de las 35 muestras fecales se secuenciaron un total de 264,97 MB, una vez que las lecturas se estabilizaron finalmente. Las secuencias se recortaron y filtraron, dejando una suma final de 393958 (540-555 nt de longitud de promedio). Después de realizar la búsqueda pertinente, las lecturas se agruparon en taxones según diferentes niveles taxonómicos, con una producción final de 10 filos, 82 familias, 223 géneros y 513 especies [12]. De estas 513 especies, 50 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos y en 17 de ellas, el grupo alimentado con aceite de oliva refinado estuvo implicado en la significación al comparar por pares. La **Figura 1** muestra la distribución de estas 17 especies en los diferentes ratones agrupados según dietas.

En este estudio nos centramos específicamente en las especies en las que existen diferencias significativas por pares entre el grupo alimentado con aceite de oliva virgen y el alimentado con aceite de oliva refinado (EVOO vs OO). Esto redujo el número de especies implicadas a seis. La **Figura 2** muestra los diagramas de cajas correspondientes a las cuatro dietas para cada una de estas especies.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio estadístico mediante modelos de regresión lineal múltiple que enfrentó los porcentajes obtenidos en las secuencias para cada especie frente a los valores detectados para las variables fisiológicas en cada ratón. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**. Se encontraron relaciones estadísticamente significativas en el caso de la presión arterial, masa corporal, ingesta, ingesta de agua y diuresis.

DISCUSIÓN

El aceite de oliva, la principal grasa en la dieta mediterránea, ha sido considerado saludable durante mucho tiempo y su influencia en la microbiota intestinal ha sido estudiada por nuestros laboratorios [8, 9]. Además, también hemos comunicado la existencia de correlaciones entre el porcentaje de

taxones bacterianos específicos y las variables fisiológicas relacionadas con el síndrome metabólico [9, 15]. Teniendo en cuenta la composición diferente de la fracción insaponificable de los diferentes aceites de oliva, una comparación entre el aceite de oliva virgen y refinado puede ayudarnos a comprender la responsabilidad de los polifenoles y otros componentes minoritarios sobre los efectos beneficiosos del aceite de oliva y la importancia de la microbiota intestinal sobre ellos.

De esta manera, hemos detectado seis especies bacterianas con porcentajes significativamente diferentes entre ratones alimentados con aceite de oliva virgen y refinado y en cinco de estas especies, los niveles detectados son mayores en refinado que en virgen extra. Dos de estas especies están relacionadas positivamente con el aumento de presión arterial. Considerando el conocido efecto antimicrobiano de los polifenoles sobre numerosas especies en el laboratorio [16], es posible que estos compuestos presentes en el aceite de oliva virgen extra y/o otros componentes minoritarios puedan estar implicados en contribuir a evitar que estas bacterias alcancen los niveles que sí se observan en la dieta ROO.

Sin embargo, la correlación no es causalidad y el hecho de descubrir dos variables que evolucionan en paralelo no indica automáticamente que una sea la causa de la otra. En el caso del presente informe, varias variables fisiológicas han demostrado que modifican sus valores en relación con la presencia de ciertos taxones bacterianos, pero se debe trabajar más para demostrar sin duda la responsabilidad de la microbiota en esos efectos. Los resultados aquí presentados delimitan el escenario para estos futuros experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Riccardi, G.; Giacco, R.; Rivellese, A. A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004, 23(4), 447-456.
2. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D. R., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011, 12(473), 174-180.
3. Albenberg, L. G.; Wu, G. D. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology* 2014, 146(6), 1564-1572.
4. Poudyal, H.; Panchal, S. K.; Diwan, V.; Brown, L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res* 2011, 50(4), 372-387.

Efecto del aceite de oliva refinado sobre la microbiota intestinal de ratones y su relación con diferentes variables fisiológicas. Comparación con el oliva virgen extra – M. Hidalgo, I. Prieto, N. Martínez, A.B. Segarra, A.M. Martínez-Rodríguez, A. Cobo, M. Ramírez, A. Gálvez, M. Martínez-Cañamero

5. Fava, F.; Gitau, R.; Griffin, B. A.; Gibson, G. R.; Tuohy, K. M.; Lovegrove, J. A. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes* 2013, 37(2), 216-223.
6. Gillingham, L. G.; Harris-Janz, S.; Jones, P. J. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids* 2011, 46(3), 209-228.
7. Martínez-González, M. A.; Martín-Calvo, N. The major European dietary patterns and metabolic syndrome. *Rev Endo Metab Disord* 2013, 14, 265-271.
8. Hidalgo, M.; Prieto, I.; Abriouel, H.; Cobo, A.; Benomar, N.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter. *Food Res Int* 2014, 64, 553-559.
9. Prieto, I.; Hidalgo, M.; Segarra, A. B.; Martínez-Rodríguez, A. M.; Cobo, A.; Ramírez, M.; Abriouel, H.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Influence of a diet enriched in virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS ONE* 2018, 13(1), e0190368.
10. Ramírez-Tortosa, C.; López-Pedrosa, J. M.; Suarez, A.; Ros, E.; Mataix, J.; Gil, A. Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: The Spanish Nutrition Study. *Br J Nutr* 1999, 82(1), 31-39.
11. Pacheco, Y. M.; López, S.; Bermúdez, B.; Abia, R.; Muriana, F. J. Extra-virgin vs. refined olive oil on postprandial hemostatic markers in healthy subjects. *J Thromb Haemost* 2006, 4(6), 1421-1422.
12. Martínez, N.; Prieto, I.; Hidalgo, M.; Segarra, A. B.; Martínez-Rodríguez, A. M.; Cobo, A.; Ramírez, M.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms* 2019, 7(2),
13. Banegas, I.; Prieto, I.; Vives, F.; Alba, F.; de Gasparo, M.; Duran, R.; et al. Asymmetrical response of aminopeptidase A and nitric oxide in plasma of normotensive and hypertensive rats with experimental hemiparkinsonism. *Neuropharmacology* 2009, 56, 573-579.
14. Segarra, A. B.; Ramirez, M.; Banegas, I.; Alba, F.; Vives, F.; de Gasparo, M.; et al. Dietary fat influences testosterone, cholesterol, aminopeptidase A, and blood pressure in male rats. *Horm Metab Res* 2008, 40, 289-291.
15. Hidalgo, M.; Prieto, I.; Abriouel, H.; Villarejo, A. B.; Ramírez, M.; Cobo, A.; Benomar, N.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. *Plant Foods Hum Nutr* 2018, 73, 1-6.
16. Medina, E.; de Castro, A.; Romero, C.; Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 2006, 12;54(14), 4954-4961. 26.

Efecto del aceite de oliva refinado sobre la microbiota intestinal de ratones y su relación con diferentes variables fisiológicas. Comparación con el oliva virgen extra – M. Hidalgo, I. Prieto, N. Martínez, A.B. Segarra, A.M. Martínez-Rodríguez, A. Cobo, M. Ramírez, A. Gálvez, M. Martínez-Cañamero

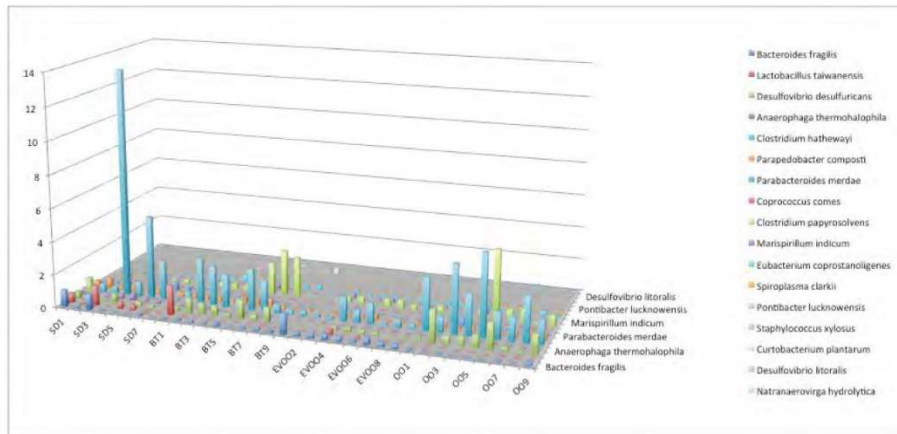


Figura 1. Distribución porcentual de secuencias correspondientes a las 17 especies microbianas que presentan diferencias significativas por pares entre la dieta enriquecida en aceite de oliva refinado (OO) y las demás dietas. Cada columna corresponde a un animal alimentado con pienso estándar (SD), enriquecido con mantequilla (BT), con aceite de oliva virgen extra (EVOO) o con aceite de oliva refinado (OO). La leyenda muestra, de izquierda a derecha y hacia abajo, el código de color de estas 17 especies.

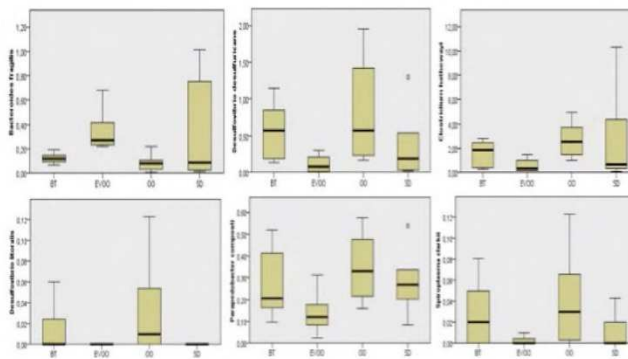


Figura 2. Diagrama de cajas de la distribución de secuencias correspondientes a las 6 especies microbianas que presentan diferencias significativas por pares entre la dieta enriquecida en aceite de oliva refinado (OO) y la dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra (EVOO). De izquierda a derecha y de arriba a abajo se presentan *Bacteroides fragilis*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium hathewayi*, *Parapedobacter composti*, *Spiroplasma clarki* y *Desulfovibrio litoralis*. SD: Dieta basada en pienso estándar; BT: Dieta enriquecida con mantequilla (BT).

Efecto del aceite de oliva refinado sobre la microbiota intestinal de ratones y su relación con diferentes variables fisiológicas. Comparación con el oliva virgen extra – M. Hidalgo, I. Prieto, N. Martínez, A.B. Segarra, A.M. Martínez-Rodríguez, A. Cobo, M. Ramírez, A. Galvez, M. Martínez-Cañamero

Tabla 1. Análisis de regresión entre especies bacterianas con diferencias significativas entre las dietas de aceite de oliva refinado y virgen extra y las variables fisiológicas estudiadas. Se indica en cada caso el signo de la relación, el coeficiente de regresión y el valor p obtenido (entre paréntesis).

	Presión arterial	Masa corporal	Ingesta sólida	Ingesta de agua	Diuresis
<i>B. fragilis</i>	-29.8988 (0.0316)		2.12264 (0.0050)		
<i>C. hathewayi</i>					-0.169738 (0.0233)
<i>P. composti</i>	84.6981 (0.0071)		3.78366 (0.0075)		5.73633 (0.0005)
<i>S. clarkii</i>				-73.5013 (0.0118)	-46.0982 (1.20e-05)
<i>D. litoralis</i>	477.013 (0.0134)	25.9798 (0.0304)		88.7411 (0.0027)	34.9037 (0.0304)

5.2. Objetivo 3

- Capítulo de libro “Estudio temporal de presencia de bacterias del ácido láctico intestinales en un modelo murino” en “Multidisciplinary health research” (colección “Actas”, Universidad de Jaén), ISBN 978-84-9439-986-5.
- Estudio de cepas de bacterias lácticas procedentes de intestino grueso de ratones alimentados con una dieta alta en aceite de oliva virgen extra.
- Detección de posibles metanógenas en intestino grueso de ratón mediante microscopía confocal de fluorescencia. Comparación entre varias dietas altas en grasa.



1^{er} CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINAR EN SALUD
Jaén, 14-15 Abril 2016

1st INTERNATIONAL CONGRESS OF MULTIDISCIPLINARY HEALTH RESEARCH
Jaén, 14-15 April 2016



UNIVERSIDAD DE JAÉN

COLECCIÓN
actas

2016

© Autores

© Universidad de Jaén

ISBN

978-84-8439-986-5

Depósito Legal

J-146-2016

Colección

Cd Actas, 41

Edita

Publicaciones de la Universidad de Jaén

Vicerrectorado de Extensión Universitaria, Deportes y Proyección Institucional

Campus Las Lagunillas, Edificio Biblioteca

23071 Jaén (España)

Teléfono 953 212 355

Fax 953 212 235

servpub@ujaen.es

ESTUDIO TEMPORAL DE PRESENCIA DE BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO INTESTINALES EN UN MODELO MURINO.

NIEVES MARTÍNEZ DE LA CASA, ANTONIO COBO MOLINOS, M^a DOLORES HERNÁNDEZ MOYA, ISABEL PRIETO GÓMEZ*, ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO, MAGDALENA MARTÍNEZ CAÑAMERO.

Área de Microbiología y *Área de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Estos últimos años, el creciente interés por conocer de qué se compone nuestra microbiota intestinal ha ido en aumento. Son numerosos los estudios de investigación científica que se llevan a cabo en este sentido, incluyendo artículos en revistas, científicas o de divulgación, fomentándose el consumo habitual de alimentos funcionales o probióticos y alabando sus beneficios para el organismo. Se sabe que al nacer, los microorganismos que van a formar parte de nuestro sistema digestivo son heredados de la propia comunidad bacteriana de la madre, siendo distinta según la forma en la que se ha llevado a cabo el parto (cesáreas, instrumental utilizado...) y de otras fuentes de inóculo a lo largo de los primeros meses de vida. Tras el destete, la microbiota alcanzará una composición que se va a mantener, aunque con variaciones dependientes de muchos factores internos y externos, hasta que, ya en la madurez, disminuya la biodiversidad intestinal (Saffrey, 2014).

En este estudio hemos utilizado un modelo murino para poner de manifiesto el efecto del transcurso del tiempo en el grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL), de gran importancia por sus implicaciones en la salud del hospedador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratones swiss western de seis semanas de edad se alimentaron durante tres meses con dieta estándar a base de cereales (Hidalgo *et al*, 2014). Al inicio, a las seis semanas y al final del experimento se extrajo ADN de las heces y se llevó a cabo secuenciación masiva (Lifesequencing, Roche GS-FLX-Titanium + 454) de las regiones V3-V5 del gen del ARNr 16S. De los datos obtenidos, seleccionamos aquellos correspondientes a las familias bacterianas del ácido láctico. Para el estudio estadístico se utilizó el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) mediante el programa Statgraphics.

RESULTADOS

En la tabla 1 se pueden observar las medias y errores del porcentaje de secuencias obtenidas pertenecientes a diferentes familias BAL con respecto al total de secuencias para cada punto temporal del experimento. Tras el análisis estadístico correspondiente, la familia *Lactobacillaceae* mostró una presencia significativamente mayor que la del resto, tanto al inicio como a las seis y a las doce semanas, mientras que los otros taxones, con mucha menor proporción, no mostraron diferencias significativas (figura 1). Cuando cada familia se estudió por separado a lo largo del tiempo, la alta variabilidad intragrupal impidió obtener datos significativos, excepto de nuevo en el caso de la familia *Lactobacillaceae* que presentó un descenso significativo de las seis a las doce semanas (figura 2).

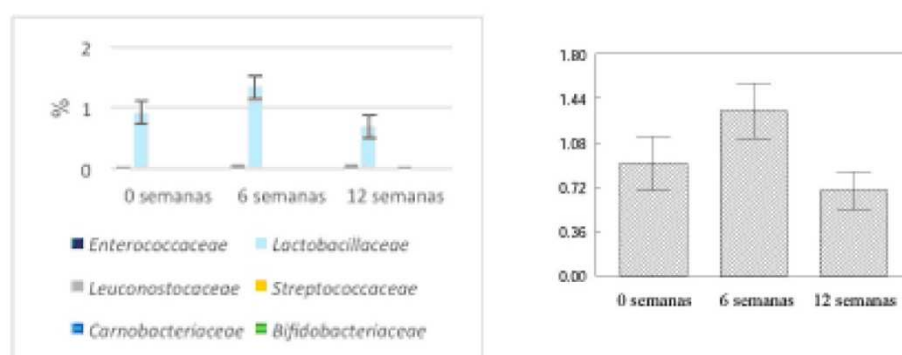


Figura 1. Porcentaje de secuencias adscritas a cada familia a las cero, seis y doce semanas de estudio.

Figura 2. Porcentaje de secuencias adscritas a la familia *Lactobacillaceae* a las cero, seis y doce semanas de estudio.

Tabla 1. Media y error, en porcentajes, de las secuencias obtenidas

Familia/semana	Media porcentaje	Error
<i>Enterococcaceae</i> 0	0.008875	0.006839
<i>Enterococcaceae</i> 6	0.025625	0.013722
<i>Enterococcaceae</i> 12	0.026	0.020287
<i>Lactobacillaceae</i> 0	0.912625	0.212519
<i>Lactobacillaceae</i> 6	1.33675	0.220716
<i>Lactobacillaceae</i> 12	0.692375	0.148997
<i>Streptococcaceae</i> 0	0.000875	0.000875
<i>Streptococcaceae</i> 6	0.002875	0.002065
<i>Streptococcaceae</i> 12	0.00775	0.005637
<i>Bifidobacteriaceae</i> 6	0.00225	0.001485
<i>Leuconostocaceae</i> 0	0.003625	0.003625
<i>Leuconostocaceae</i> 12	0.002625	0.002625

CONCLUSIONES

- Hay diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de la familia *Lactobacillaceae* y el resto de familias de bacterias del ácido láctico a las 0, 6 y 12 semanas de dieta, siendo las primeras más preponderantes en todos los casos.
- Para el resto de familias, en ninguna de las etapas del estudio hemos podido encontrar ninguna diferencia significativa.
- La microbiota intestinal murina sufre un descenso estadísticamente significativo en el porcentaje de la familia *Lactobacillaceae* entre las 6 y las 12 semanas de dieta (12 y 18 semanas de vida de los ratones).

REFERENCIAS

- Hidalgo, M., Prieto, I., Abriouel, H., Cobo, A., Benomar, N., Gálvez, A., Martínez-Cañamero, M. (2014). Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter. Food Research International. 64 553-559.

- Saffrey M. Jill (2014). Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system. *Age*, 36: 9603.

Estudio de cepas de bacterias lácticas procedentes de intestino grueso de ratones alimentados con una dieta alta en aceite de oliva virgen extra.

Introducción:

La alta biodiversidad microbiana que podemos encontrar en el sistema gastrointestinal se encuentra regida por las interacciones de los microorganismos que la componen, así como la fisiología del huésped, que, por regla general, está influenciada por la dieta y la genética del individuo. La dieta, uno de estos factores, va a ser el principal elemento que regulará la adaptabilidad de los microorganismos al medio y actuará como recurso por el cual competir. Este proceso favorecerá que los microorganismos desarrollen mecanismos de defensa y estrategias de adaptación. Dependiendo pues del tipo de dieta, la adaptación de algunos grupos bacterianos se verá más favorecida que en otros.

En este estudio, vamos a estudiar la presencia de bacterias del ácido láctico, concretamente del género *Lactobacillus*, presentes en el intestino grueso de ratones alimentados con una dieta rica en aceite de oliva virgen extra. Este aceite vegetal insaturado destaca por la gran importancia dentro de la Dieta Mediterránea, y en las últimas décadas, se le ha relacionado con multitud de efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador (Williams *et al.*, 1987). Además, el consumo ininterrumpido del aceite de oliva y la cantidad de ingesta que se haga de este puede modular el crecimiento de determinados grupos bacterianos dentro del complicado entramado que es la microbiota intestinal (Brenes *et al.*, 2010).

El objetivo del estudio era poder aislar cepas que previamente se habían identificado en un estudio metagenómico realizado con anterioridad (Martínez *et al.*, Microorganisms 2019) y que presentaban interés por su comportamiento diferencial en distintas dietas.

Material y métodos:

Para este trabajo, utilizamos muestras congeladas de intestino grueso de ratones que habían estado sometidos a una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra durante 12 semanas. Se aislaron cepas de dos ratones de este grupo (animales 20V y 80V). Para ello se homogeneizó en solución salina al 0,85%

estéril una porción de 2 cm de intestino grueso, previamente diseccionado y abierto, que se sembró en medio MBA en anaerobiosis a una temperatura de 37°C durante 3-4 días. De aquí, se aislaron en torno a 65 colonias de aspecto similar.

Identificación preliminar:

Tras el aislamiento de las colonias en medio selectivo y atmósfera anaeróbica, se realizó una tinción de Gram de todas ellas, descartándose las Gram negativas y guardando las Gram positivas con morfología bacilar o coco-bacilar.

Del total de cepas aisladas, se redujo la colección a 11 cepas, todas ellas procedentes del animal 8OV.

Pruebas bioquímicas:

Una vez aisladas las 11 cepas, se procedió a una serie de pruebas bioquímicas para poder determinar sus características:

Producción de enzimas como la catalasa (prueba de la catalasa con peróxido de hidrógeno), o enzimas degradadoras de almidón o proteínas lácteas (crecimiento en medio Agar Almidón y Agar Leche), crecimiento en medio para halotolerantes (MRS agar + NaCl 6,5%), producción de gases (MRS con campana de Durham) y crecimiento selectivo en medio KAA (Scharlau).

Producción de bacteriocinas:

Se realizó un estudio de la producción de proteínas con actividad antimicrobiana. Para ello se siguió el protocolo de Schillinger y Lucke, 1989. Se usó como medio base MRS tamponado con sobrecapa de BHI tamponado, donde creció una cepa de *Staphylococcus aureus* como bacteria indicadora. También se estudió la producción de bacteriocinas en medios no tamponados para comprobar la inhibición del crecimiento de la indicadora por la producción de ácidos.

Presencia de genes para aminos biógenas:

Se realizó un estudio a nivel genético de la presencia de genes involucrados en la producción de aminos biógenas: Histamina (hdc), Tirosina (tdc) y Ornitina (odc) (Martín-Platero *et al.*, 2009; Perin *et al.*, 2014; Cebrián *et al.*, 2012).

Secuenciación de cepas:

Para la determinación de las especies se realizó una secuenciación de la región conservada 16S de todas las cepas.

Resultados:*Pruebas bioquímicas:*

Tras la realización de la tinción de Gram, se conservó en la colección aquellas cepas que presentaban bacterias con morfología bacilar Gram positivas a las que se le realizaron diferentes pruebas bioquímicas (Tabla 1). De todas ellas ninguna cepa presentó la enzima catalasa ni degradaron de manera enzimática las proteínas de la leche. Cuatro de las once cepas sí que degradaron el almidón, observándose un halo de degradación tras la adición de lugol al medio.

Todas las cepas excepto cuatro, son halotolerantes a una concentración de 6,5% de NaCl, y ninguna es productora de gases.

No todas las cepas crecen en medio KAA específico para enterococos, y las que sí lo hacen, producen un precipitado dando un halo de tonalidad oscura.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas									
Cepa	Gram	Morfología	Catalasa	MRS + NaCl 6,5%	Agar Leche	Agar Almidón	Medium KAA		Producción de gas (Durham's bell)
							Crecimiento	Viraje	
IG8-1	Positivo	Coco-bacilos	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negro	Negativo
IG8-2	Positivo	Coco en parejas	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negro	Negativo
IG8-3	Positivo	Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negro	Negativo
IG8-4	Positivo	Bacilo largo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Sin viraje	Negativo
IG8-5	Positivo	Bacilo largo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Sin viraje	Negativo
IG8-6	Positivo	Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negro	Negativo
IG8-7	Positivo	Bacilo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Sin viraje	Negativo
IG8-9	Positivo	Bacilo largo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Sin viraje	Negativo
IG8-10	Positivo	Bacilo largo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Sin viraje	Negativo
IG8-11	Positivo	Bacilo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Sin viraje	Negativo
IG8-14	Positivo	Coco-bacilos	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negro	Negativo

Producción de sustancias con actividad antimicrobiana:

El ensayo de la producción de sustancias con actividad antimicrobiana (bacteriocinas) (Tabla 2) en medio no tamponado mostró un halo de inhibición en todas las cepas excepto en tres de ellas. La cepa IG8-1 fue la que produjo un halo de mayor tamaño (6mm) seguida de IG8-2 con un halo de 5mm. El mismo ensayo, pero en medio tamponado, redujo considerablemente el número de cepas formadoras de halo a solo tres, con un halo de 2mm de diámetro. Las tres cepas que presentan halo en medio tamponado corresponden con las cepas que dieron mayor halo de inhibición en medio no tamponado, por lo que se puede entender que el resto de halos positivos en medio no tamponado se debe a la producción de ácidos por parte de la bacteria.

Tabla 2. Producción de bacteriocinas				
Cepa	MRS sin tamponar		MRS tamponado	
	Crecimiento	Halo (mm)	Crecimiento	Halo (mm)
IG8-1	Positivo	6	Positivo	2
IG8-2	Positivo	5	Positivo	2
IG8-3	Positivo	1	Positivo	0
IG8-4	Positivo	3	Positivo	0
IG8-5	Positivo	1	Positivo	0
IG8-6	Positivo	4	Positivo	2
IG8-7	Positivo	1	Positivo	0
IG8-9	Positivo	2	Positivo	0
IG8-10	Positivo	0	Positivo	0
IG8-11	Positivo	0	Positivo	0
IG8-14	Positivo	0	Positivo	0

Presencia de genes de aminas biógenas:

Las cepas aisladas, fueron sometidas al estudio de la presencia de genes relacionados con la expresión de aminas biógenas. Ninguna de las cepas, como muestra la tabla 3, presentaron genes relacionados con estas aminas.

Tabla 3. Aminas biógenas			
Cepa	Tirosina (tdc)	Ornitina (odc)	Histamina (hdc)
IG8-1	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-2	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-3	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-4	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-5	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-6	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-7	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-9	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-10	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-11	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-14	Negativo	Negativo	Negativo

Determinación de especies por secuenciación de ARNr16S:

Tras la secuenciación de las cepas aisladas (Tabla 4), se dedujo que la cepa IG8-2, es la única que no pertenece al género *Lactobacillus*. Las cepas IG8-4 y IG8-5 pertenecen a la cepa *Lactobacillus johnsonii* strain BTA 80. El resto de cepas pertenecen todas a la especie *Lactobacillus murinus*, dos de ellas a la cepa C-30, cinco de ellas a la cepa HF12 y solo una a la cepa Algae-6.

Tabla 4. Identificación de especies			
Cepa	Especie	Query (%)	Ident (%)
IG8-1	<i>Lactobacillus murinus</i> Algae-6	100	98
IG8-2	<i>Enterococcus faecalis</i> strain OZB10 69	99	95,11
IG8-3	<i>Lactobacillus murinus</i> strain HF12	97	95,78
IG8-4	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain BTA 80	100	100
IG8-5	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain BTA 80	97	98,73
IG8-6	<i>Lactobacillus murinus</i> strain HF12	98	98
IG8-7	<i>Lactobacillus murinus</i> strain HF12	98	96,24
IG8-9	<i>Lactobacillus murinus</i> strain C-30	96	94,08
IG8-10	<i>Lactobacillus murinus</i> strain C-30	98	98,5
IG8-11	<i>Lactobacillus murinus</i> strain HF12	98	98
IG8-14	<i>Lactobacillus murinus</i> strain HF12	98	98,29

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido subvencionado por el Proyecto de Excelencia con referencia AGR 6340 y equipo de investigación AGR230.

Referencias:

Brenes, M., Medina, E., García, A., Romero, C., Castro, A. (2010) Olives and Olive Oil Compounds Active Against Pathogenic Microorganisms, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Elsevier. United States of America 109, 1013-1019.

Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. (2012) Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol.* 30(1), 59-67

Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol.* 1, 132(1), 24-32.

Perin, L.M., Miranda, R.O., Todorov, S.D., Franco, B.D., Nero, L.A. (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int J Food Microbiol.* 18, 185, 121-126

Schillinger, U., Lucke, F. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiology*, 55, 1901-1906.

Williams, T., Fortmann, S. P., Terry, R. B. (1987). Associations of dietary fat, regional adiposity, and blood pressure in men. *Journal of the American Medical Association*, 257, 3251–3256.

Detección de posibles metanógenas en intestino grueso de ratón mediante microscopía confocal de fluorescencia.

Comparación entre varias dietas altas en grasa.

Introducción

La mayoría de investigaciones sobre la microbiota intestinal que se realizan hoy día están enfocadas al estudio de bacterias, microorganismos que predominan en el tracto gastrointestinal de muchos seres vivos. Sin embargo, en los últimos años ha ido adquiriendo más importancia la relación de las arqueas con el ser humano.

Las arqueas son un dominio de organismos procariotas que suelen encontrarse en ambientes con condiciones extremas. Estudios más recientes han demostrado que algunos grupos de arqueas viven en todo tipo de ambientes, incluyendo el cuerpo humano (Gaci *et al.*, 2014). Uno de estos grupos es el de las arqueas metanógenas, microorganismos anaerobios del tracto gastrointestinal que utilizan hidrógeno para reducir dióxido de carbono, acetato y otros metabolitos de diferentes bacterias, y producen de esta manera metano (CH₄). La metanógena más abundante en el intestino del ser humano es *Methanobrevibacter smithii*.

Para producir estas reacciones metanogénicas, las arqueas metanógenas necesitan una serie de coenzimas determinados específicos de este tipo de microorganismos. Estos coenzimas se dividen en dos tipos: los transportadores, como el metanofurano, la tetrahidrometanipterina y la coenzima M; y los redox, entre las que encontramos el factor 420 (F₄₂₀), la coenzima B y el complejo enzimático metil-reductasa.

El F₄₂₀ actúa como donador de electrones en estos procesos, de manera que su forma oxidada tiene la capacidad de absorber luz a 420 nm y emitir fluorescencia en el rango del azul-verde. Es esta propiedad de autofluorescencia de las arqueas la que hemos utilizado en nuestro trabajo para detectar mediante microscopía la presencia de metanógenas en nuestras muestras.

Estudios preliminares anteriores realizados en nuestro grupo de investigación (Hidalgo M. Tesis doctoral. 2015) habían puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas en la presencia de metanógenas en intestino de ratón entre aquellos alimentados con una dieta alta en mantequilla frente a otras tres dietas (dieta estándar y dieta enriquecida con aceite de oliva

refinado u oliva virgen). Como este análisis se había realizado sólo en tres ratones de cada dieta, el objetivo de este trabajo fue ampliarlo hasta abarcar el resto de muestras que se mantenían archivadas para ver si se mantenía el resultado.

Material y Métodos

Para ello, visualizamos en el microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP5 II, a 405 nm, del Centro de Instrumentación Científico-Técnica, muestras de mucosa de intestino grueso pertenecientes a cada uno de los ratones utilizados, de manera que se detectó la presencia de microorganismos metanógenos en todas las muestras observadas, realizándose un total de cinco imágenes en cinco áreas diferentes para cada muestra, en las esquinas y centro de los campos. Una vez obtenidas las imágenes correspondientes a cada muestra, se procedió al conteo de arqueas metanógenas con la ayuda del software informático Image J, y posteriormente se trataron los datos obtenidos en una hoja de cálculo con formato “Excel”, a los que se añadieron también los datos anteriores analizándose por separado y en conjunto.

Como control positivo se utilizaron muestras obtenidas del digestor anaeróbico de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Jaén. Como control negativo se utilizó un cóctel de cepas intestinales no metanogénicas obtenidas de nuestra colección: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella entérica* y *Escherichia coli*, todas ellas obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España.

Resultados y discusión

En la tabla 1 y figura 1 se observan los resultados obtenidos (en sombreado y asterisco se muestran los recuentos llevados a cabo con anterioridad). En los ocho ratones alimentados con la dieta ST, se observó un número reducido de metanógenas, en torno a 0,2 – 1,6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias). En los grupos de animales con dietas de AOVE y AOR se encontraron valores promedio muy similares a los de la dieta ST, también en torno a 0,2 – 1,6 UFC, destacando aquí el conteo del ratón O5, con un promedio de 3,4 UFC. Al analizar los datos del conteo de las muestras basadas en la dieta BT, encontramos una valores promedio de entre 0,2 – 12,6 UFC, mucho más elevados en relación a con los otros grupos. Sin embargo, pudimos constatar que las diferencias observadas se debían principalmente a los datos previos, mientras que los obtenidos en este estudio presentaban valores mucho más cercanos (figura 2).

Tabla 1. Datos de los conteos y valores promedio

Dieta	Animal	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 3	Conteo 4	Conteo 5	Promedio de los individuos
Estándar	ST1*	3	0	2	0	0	1
	ST2*	0	0	1	0	0	0,2
	ST3	0	0	0	0	0	0
	ST4*	0	2	6	0	0	1,6
	ST5	0	0	0	0	0	0
	ST6	0	0	1	0	0	0,2
	ST7	1	0	0	0	0	0,2
	ST8	0	0	0	0	1	0,2
	ST9	-	-	-	-	-	-
Mantequilla	M1*	7	14	7	4	12	8,8
	M2*	10	29	7	3	14	12,6
	M3*	5	7	6	9	3	6
	M4	0	1	1	0	0	0,4
	M5	1	0	1	0	0	0,4
	M6	0	0	0	0	0	0
	M7	0	1	0	0	0	0,2
	M8	0	0	0	0	0	0
	M9	0	0	0	0	0	0
Aceite de oliva refinado	OR1	0	0	0	0	0	0
	OR2	1	0	0	0	0	0,2
	OR3	0	0	0	0	0	0
	OR4	0	0	0	0	0	0
	OR5*	1	4	8	0	4	3,4
	OR6*	3	0	0	1	0	0,8
	OR7*	1	5	0	0	1	1,4
	OR8	0	0	0	0	0	0
	OR9	1	1	0	0	1	0,6
Aceite de oliva virgen extra	AOVE1	0	0	0	0	0	0
	AOVE2	0	1	0	0	0	0,2
	AOVE3	1	2	0	1	0	0,8
	*	1	0	0	0	0	0,2
	AOVE4	2	0	0	1	0	0,6
	AOVE5	1	0	2	2	3	1,6
	*	1	0	0	0	0	0,2
	AOVE6	0	0	0	0	0	0
	*	2	0	0	1	1	0,8
	AOVE7						
	AOVE8						
	AOVE9						

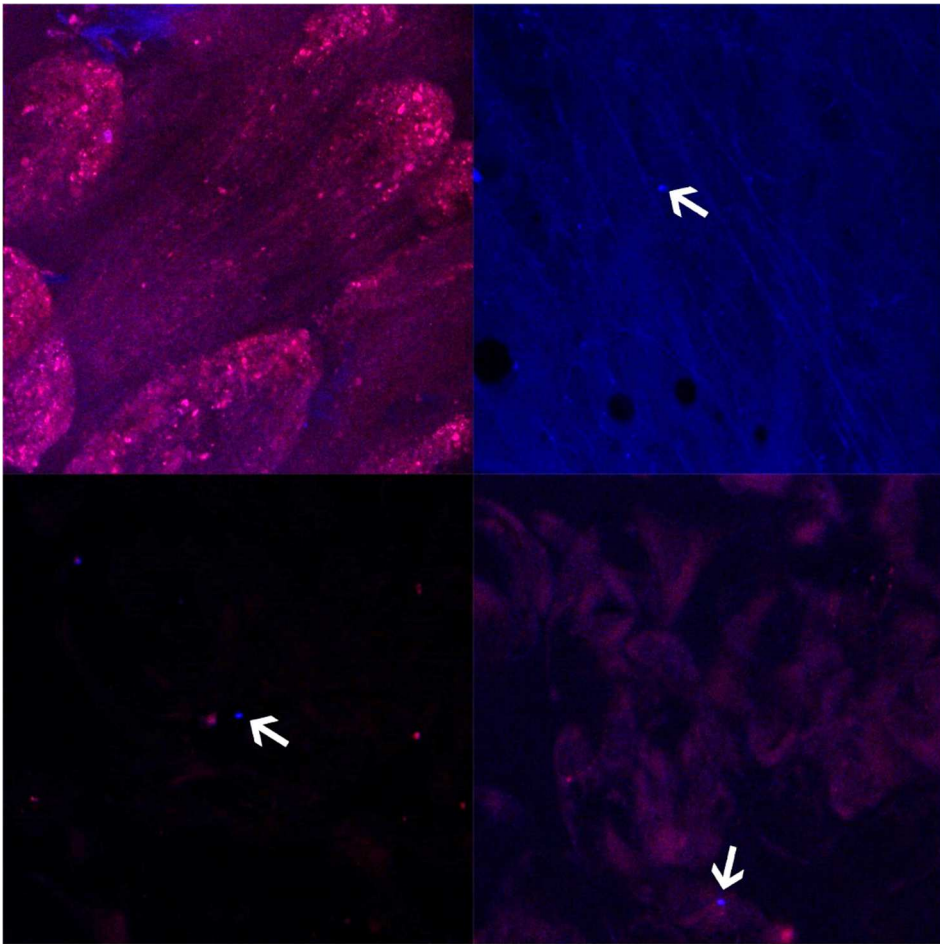


Figura 1. Visualización de muestras en el microscopio confocal, zoom X2. A: ST8; B: M4; C: OR9; D: AOVE9.

El análisis estadístico mediante ANOVA entre los distintos grupos estudiados nos indicó que existe una tendencia con una significación al 90% de $p=0,080$ a que el recuento sea mayor en el caso del grupo M. La figura 2 muestra el análisis de medias y el 95% de confianza con el test de LSD Fisher (Least Significant Difference), que permite comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Además, los datos obtenidos mostraron no tener una distribución normal por lo que se prefirió comprobar el resultado con una ANOVA robusta de una vía, independiente de la igualdad de las varianzas, así como con un análisis Kruskal-Wallis para datos no normalizados. En ninguno de los dos casos se obtuvo significación, el ANOVA robusta dio un valor p de 0,4151 y el análisis Kruskal-Wallis un valor incluso mayor, de 0,8531.

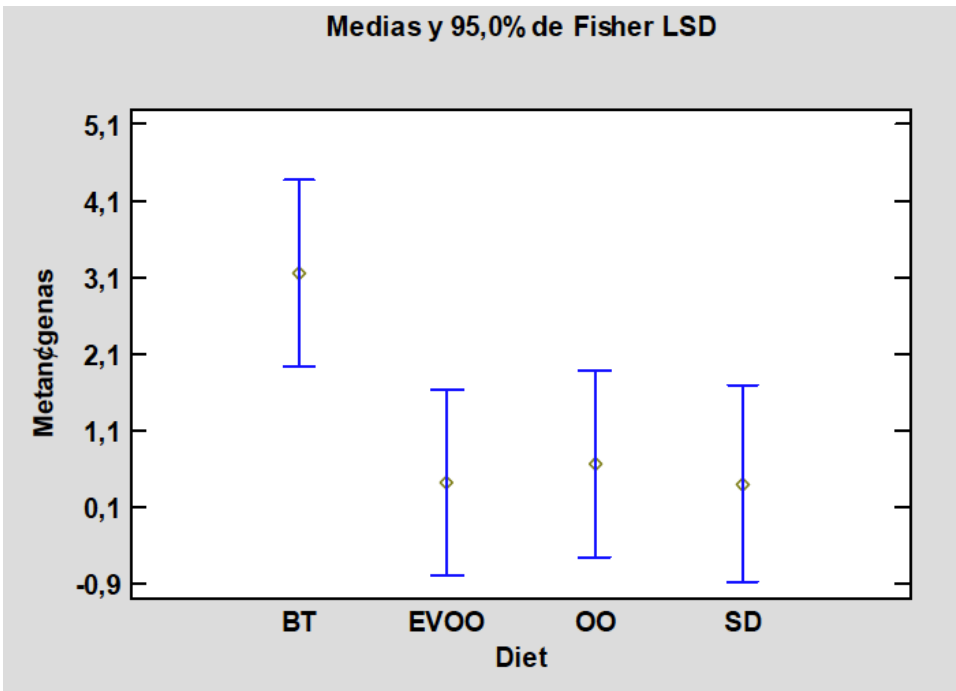


Figura 2. Medias de los datos obtenidos en el recuento de fluorescencia para cada dieta e intervalo de confianza al 95% del test de LSD de Fisher. BT, dieta alta en mantequilla; EVOO, dieta alta en aceite de oliva virgen extra; OO, dieta alta en aceite de oliva refinado; SD, dieta estándar.

Como el problema estadístico parecía provenir de la falta de homocedasticidad provocada por los tres valores de mantequilla obtenidos con anterioridad, se volvió a repetir el análisis considerando sólo los valores obtenidos en este estudio. En este caso, el ANOVA cumplía todos los requisitos de igualdad de varianzas y normalidad, pero se perdía toda significación estadística ($p=0,7535$). Con estos resultados intentamos diseñar estudios de correlación de variables que nos permitieran atisbar cual había sido la diferencia entre un análisis y otro que diera lugar a resultados tan diferentes. De esta manera, se buscaron correlaciones lineales entre los datos obtenidos en el recuento de fluorescencia y todas las variables fisiológicas estudiadas, así como con los porcentajes del resto de taxones obtenidos a nivel de familias mediante el estudio metagenómico presentado en esta misma memoria (Martínez *et al.*, 2019). De esta manera, en colaboración con el grupo de investigación BIO-221, se estudiaron las posibles correlaciones entre los datos obtenidos en el recuento de metanógenas y los valores detectados al final del experimento en todas las variables fisiológicas investigadas en los ratones por dicho grupo (peso corporal, glucosa en ayunas, ingesta de agua y alimento, diuresis, PA, colesterol total, colesterol HDL y LDL, ratio HDL/LDL, triglicéridos, leptina, ghrelina e insulina). Se

obtuvo buena correlación ($R=0,73$) y con significación al 95% con los datos de colesterol total. La relación del nivel de presencia de metanógenas intestinales con el colesterol total y/o con la obesidad no es nuevo (Mathur *et al.*, 2017). Con respecto a los grupos taxonómicos, se compararon con los datos de 82 familias bacterianas, obteniéndose buena correlación significativa al 95% con *Haloplasmataceae* ($R=0,69$) y *Desulfonatronumaceae* ($R=0,74$). También hubo correlación significativa con *Bifidobacteriaceae* y *Acidimicrobiaceae*, pero con un coeficiente de correlación mucho menor (0,58 y 0,49 respectivamente).

Estos resultados, como se discutirá posteriormente, nos hicieron pensar que las diferencias encontradas entre nuestros datos y los obtenidos anteriormente no se debían, al menos en su mayor parte, al hecho de haber realizado el estudio por separado, sino que debía existir un factor, independientemente de este hecho, que afectase a familias bacterianas adaptadas a ambientes más apartados de condiciones consideradas mesófilas. En cualquier caso, nuestro estudio nos volvió a confirmar la idoneidad del uso de la autofluorescencia de las metanógenas para poner de manifiesto la presencia de este grupo en el microbioma intestinal y marca el camino a seguir en investigaciones futuras.

Agradecimientos

Agradecer el aporte de microscopio confocal de fluorescencia al Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT – Universidad de Jaén).

Referencias

Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère JF. Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 21;20(43):16062-78.

Hidalgo M. Estudio de la influencia del aceite de oliva sobre la microbiota del tracto gastrointestinal de roedores. Tesis doctoral. 2015. Universidad de Jaén.

Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019 Feb 23;7(2). pii: E61.

Mathur R, Mundi MS, Chua KS, Lorentz PA, Barlow GM, Lin E, Burch M, Youdim A, Pimentel M. Intestinal methane production is associated with decreased weight loss following bariatric surgery. *Obes Res Clin Pract*. 2016 Nov - Dec;10(6):728-733. ; Laverdure R, Mezouari A, Carson MA, Basiliko N, Gagnon J. A role for methanogens and methane in the regulation of GLP-1. *Endocrinol Diabetes Metab*. 2017 Dec 1;1(1):e00006.

5.3. Objetivo 4

- Capítulo de libro “Estudio comparativo del efecto del aceite de oliva y el oliva virgen sobre cepas de enterococos” en “XVIII Simposium científico-técnico. Expoliva”. Fundación del Olivar. Jaén. 2017. ISBN. 978-84-946839-1-6.

Estudio comparativo del efecto del aceite de oliva y el oliva virgen sobre cepas de enterococos

Nieves Martínez, Laura Morales, Antonio Cobo, Isabel Prieto, Beatriz Sánchez, Antonio Gálvez,
Magdalena Martínez-Cañamero

Área de Microbiología, Área de Fisiología, Dpto. Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. Jaén (España)

RESUMEN

En investigaciones anteriores se ha observado el efecto protector del Aceite de Oliva contra la acción de múltiples microorganismos patógenos, favoreciendo la promoción de la salud. En este estudio se ha aislado una colección de cepas bacterianas de enterococos en diversas muestras de alimentos y ambientales. Se cribó la colección a través de la aplicación de numerosas pruebas bioquímicas donde se puso de manifiesto la identidad del género *Enterococcus*. Por último se realizaron tres tipos de ensayos aplicando distintas técnicas (ensayo con papel de filtro, ensayo con ácido cólico y ensayo con lecitina), para comparar la capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano entre el aceite de oliva virgen extra y el aceite de oliva. Se observó como resultado final que el aceite de oliva virgen extra produce la inhibición parcial del crecimiento en las cepas bacterianas de *Enterococcus* de la colección, frente al efecto producido por aceite de oliva, que no posee ninguna actividad antimicrobiana, favoreciendo el crecimiento de la mayoría de las cepas.

Palabras clave: Aceite de Oliva, *Enterococcus*

INTRODUCCIÓN

Enterococcus es un género perteneciente a las bacterias del ácido láctico. Son organismos comensales bien adaptados al tracto gastrointestinal humano pero también causantes de múltiples infecciones clínicas como meningitis, infección urinaria y endocarditis (Díaz *et al.*, 2010). La presencia de *Enterococcus* en alimentos se debe principalmente a una errada práctica culinaria o una deficiente higiene. Estas acciones favorecen la introducción de estos microorganismos en el interior de la cadena alimentaria. Para eludir una posible infección es necesario prestar especial atención a los alimentos y valorar adecuadamente su grado de preparación a la hora de ingerirlos. Para ello debemos evitar comer alimentos poco cocidos o que hayan estado en contacto con alimentos crudos o utensilios contaminados.

Los enterococos están asociados a distintos tipos de alimentos como por ejemplo los quesos tradicionales europeos fabricados con leche cruda y pasteurizada. La existencia de enterococos en leche y queso se debe a una contaminación con las heces de las vacas lecheras a través de agua contaminada o

debido a una mala higiene en el equipo de ordeño. También hay que mantener unas condiciones óptimas en los tanques de almacenamiento de leche a granel. Estos microorganismos al encontrarse en el tracto gastrointestinal de los animales poseen grandes posibilidades de llegar a infectar la carne en el momento de la matanza. Se han aislado enterococos en numerosas variedades de carne destacando la de vacuno, de cerdo y aves de corral. Los enterococos no solo se encuentran en las carnes frescas, sino también las procesadas ya que poseen una gran resistencia a la temperatura (Franza *et al.*, 2003).

El aceite de oliva goza de una gran importancia dentro de la dieta mediterránea, relacionándosele con muchos de los beneficios que esta dieta tiene sobre la salud (Williams *et al.*, 1987). Esto es debido tanto por su riqueza en ácidos grasos insaturados como en la presencia de polifenoles en el caso del aceite de oliva virgen. De hecho, se han formado empresas cuyo cometido es la comercialización de extractos de hojas de olivo para tratar múltiples enfermedades provocadas por microorganismos patógenos. Se ha observado que el hidroxitirosol, un componente dentro de la fracción de lauropeína, inhibió el crecimiento de diversos organismos, entre ellos *Lactobacillus plantarum*. La acción bactericida del aceite de oliva virgen extra es superior a la de otros productos alimenticios como el té, vino, café o cerveza entre otros. El aceite de oliva es un ingrediente que obstaculiza el crecimiento de diversos microorganismos muy utilizado en la creación de alimentos procesados. También ejerce una función protectora contra los agentes patógenos transmitidos por los alimentos cuando se ingiere comida contaminada. Por el contrario estos efectos no han sido encontrados en otros aceites de origen vegetal como el aceite de girasol, maíz, soja, algodón y colza (Brenes *et al.*, 2010).

Se ha descubierto una alta capacidad bactericida *in vitro* por parte del aceite de oliva hacia bacterias entéricas patógenas como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*, y contra bacterias entéricas beneficiosas como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*. Las cepas *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis* y

Bacteroides vulgatus mostraron una alta sensibilidad al hidroxitirosol, mientras que las especies *Clostridium perfringens*, *Clostridium clostridiforme* y *Enterococcus faecalis* mostraron una sensibilidad moderada o no se observó. El consumo de aceite de oliva podría modular el crecimiento de la microbiota intestinal, aunque esto será dependiente de la cantidad de aceite de oliva ingerido y la cantidad de polifenoles absorbidos antes de que alcancen el colon (Brenes M., et al 2010).

En este sentido, estudios anteriores no han verificado la capacidad bactericida de distintos componentes del aceite de oliva (hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína) frente a la especie *Enterococcus faecalis* (Medina E., et al 2009). Incluso fue analizada la capacidad bactericida de componentes de diferentes tipos de aceite de origen vegetal, revelando un efecto nulo sobre las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Medina E., et al 2009). Sin embargo, todos estos estudios están llevados a cabo solo en sendas cepas representantes de ambas especies. Por ello, nosotros hemos llevado a cabo un estudio comparativo más amplio utilizando dos tipos de aceite, el de oliva y el virgen extra, con muy diferentes niveles de polifenoles, para evaluar sus efectos sobre una colección de cepas de enterococos ambientales y de alimentos aislada en nuestro laboratorio (Morales et al, 2015).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron un total de 131 cepas de enterococos.

Ensayo con papel de filtro: 150 ml de cultivo bacteriano se sembraron en medio BHA (Scharlab) y la siembra se puso en contacto en condiciones axénicas con 2cm² de papel de filtro empapado en solución salina, aceite de oliva o aceite de oliva virgen, tras lo cual se incubó durante 24h a 37°C.

Ensayo con ácido cólico: 150 ml de cultivo bacteriano se sembraron en medio BHA (Scharlab) y sobre la siembra se colocaron, en condiciones axénicas, gotas de 5 µl de emulsión de ácido cólico, al 1% en agua, con aceite de oliva o aceite de oliva virgen, en proporción 1:1, así como gotas 5 µl de ácido cólico al 1% como control, tras lo cual las placas se incubaron durante 24h a 37°C.

Ensayo con lecitina: 150 ml de cultivo bacteriano se sembraron en medio BHA (Scharlab) y sobre la siembra se colocaron, en condiciones axénicas, gotas de 5 µl de emulsión de lecitina al 3% con aceite de oliva o aceite de oliva virgen, en proporción 1:1, así como gotas 5 µl de lecitina al 3% como control, tras lo cual las placas se incubaron durante 24h a 37°C.

A las 24 horas se evaluó el crecimiento microbiano en las placas.

RESULTADOS

Tras 24 horas de incubación a 37°C, se comprobó la existencia o no de crecimiento en las placas. En el caso del ensayo con papel de filtro, como muestra la Figura 1, todas las cepas de la colección bacteriana mostraron un óptimo crecimiento en las placas con solución salina. También se observó crecimiento uniforme de la gran mayoría (98%) de las cepas bacterianas en las placas en contacto con aceite de oliva. Sin embargo, el resultado con el aceite de oliva virgen extra fue drásticamente diferente, mostrando todas las cepas inhibición parcial del crecimiento excepto en el caso de 12 de las 131 cepas ensayadas.

Para poder simular el efecto de los aceites en el sistema digestivo del hospedador, se ensayaron tras ser emulsionados con ácido cólico, uno de los ácidos biliares producidos por el organismo. En este caso sólo hubo crecimiento constante y continuo en las placas con aceite de oliva, mientras que todas las cepas mostraron inhibición parcial del crecimiento en contacto con una emulsión con aceite de oliva virgen (Figura 2).

Finalmente, también se llevó a cabo un ensayo con lecitina, emulgente producido también de manera natural en tejidos animales (Figura 3). De nuevo en este caso el resultado fue similar al anterior, inhibiéndose parcialmente todas las cepas en contacto con la emulsión con aceite de oliva virgen extra pero no así con aceite, donde las cepas presentaron un crecimiento óptimo.

DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que existe una clara diferencia entre el aceite de oliva y el virgen extra en cuanto sus propiedades antimicrobianas sobre el género *Enterococcus*, siendo el aceite de oliva virgen el único que ha demostrado poseer capacidad bacteriostática/bactericida frente a todas las cepas de la colección bacteriana de este género aisladas por nosotros a partir de distintos alimentos y muestras ambientales.

La actividad antimicrobiana del aceite de oliva virgen extra destaca principalmente frente a la inactividad observada en el aceite de oliva, ya que en los tres ensayos desarrollados (papel de filtro, ácido cólico y lecitina) se ha comprobado que todas las cepas de la colección han mostrado crecimiento en presencia de este segundo tipo de aceite.

Sin embargo, en el caso del aceite de oliva virgen extra se advierte claramente que en el primer ensayo del aceite con el papel de filtro hay una inhibición parcial de todas las cepas bacterianas excepto en un dos por ciento. Esto puede deberse a que estos aislados en concreto presentan características diferentes al resto de bacterias de la colección aumentando la resistencia de la bacteria para crecer en el medio con aceite de oliva virgen extra. En este sentido, si se sigue confirmando el resultado, es importante llevar a cabo estudios más profundos para comprobar la asignación taxonómica a nivel de especie de estas cepas, así como realizar un genotipado si es necesario, con objeto de comprobar si esta propiedad surge en la colección asociada a determinados rasgos taxonómicos.

En el segundo y tercer ensayo con aceite de oliva virgen extra, donde este último fue emulsionado con ácido cítrico y lecitina, se verificó que existía una inhibición parcial de todas las cepas bacterianas de enterococos pertenecientes a la colección. El crecimiento fue inhibido incluso en las cepas donde había habido crecimiento en el ensayo anterior, quizás gracias a la mejor emulsión de aceite que favorece un acceso más conveniente de sus componentes a todas las bacterias.

Aunque este es un estudio preliminar y a falta de llevar a cabo trabajos más profundos que pongan de manifiesto la dosis inhibitoria mínima, los resultados

obtenidos nos sugieren la diferencia en la capacidad del aceite de oliva y el oliva virgen para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, ya sea mediante contacto directo, como es en el caso de alimentos que se ingieren crudos (ensaladas, etc.) como tras emulsión con ácidos biliares, una vez ingeridos los alimentos contaminados.

BIBLIOGRAFÍA

- Brenes M., Medina E., García A., Romero C., Castro A. (2010) Olives and Olive Oil Compounds Active Against Pathogenic Microorganisms, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. (ed.) Elsevier. ISBN, 978-0-12-374420-3. United States of America (EEUU). 109, 1013-1019.
- Díaz, M., Rodríguez, C., Zhurbenko, R. (2013). Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. Rev Cubana Hig Epidemiol 51 (1).
- Franza, C., Stiles, M., Heinz, K., Holzapfel, W. (2003). Enterococci in foods a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology, 88, 105 – 122.
- Medina, E., Castro, A., Romero, C., Brenes, M. (2009) Bactericidal Activity of Glutaraldehyde-like Compounds from Olive Products. Journal of Food Protection, 72, (12), 2611–2614.
- Morales Hervás, L., Cobo Molinos, A., Martínez Cañamero, M. (2015) Efecto del aceite de oliva virgen y sobre cepas bacterianas aisladas de alimentos y ambientales. Memoria de Trabajo Fin de Grado. Universidad de Jaén.
- Williams, T., Fortmann, S. P., & Terry, R. B. (1987). Associations of dietary fat, regional adiposity, and blood pressure in men. Journal of the American Medical Association, 257, 3251–3256.

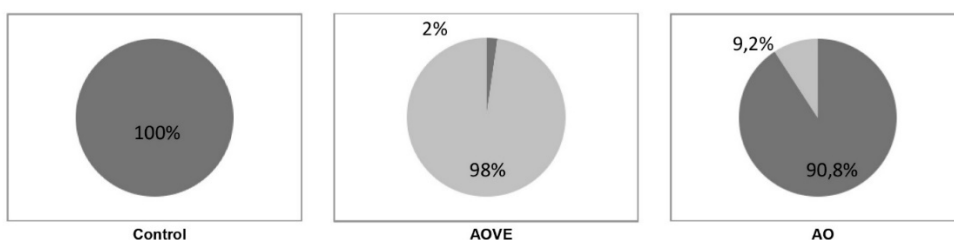


Figura 1: Porcentaje de cepas que presentaron crecimiento sin inhibición y con inhibición parcial tras el ensayo realizado con papel de filtro en el caso del control (solución salina), aceite de oliva virgen extra (AOVE) y aceite de oliva (AO) (gris oscuro: crecimiento sin inhibición; gris claro: inhibición parcial).

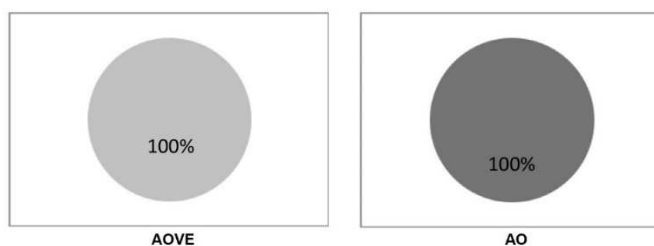


Figura 2: Porcentaje de cepas que presentaron crecimiento sin inhibición y con inhibición parcial tras el ensayo realizado con aceite de oliva virgen extra (AOVE) y aceite de oliva (AO) emulsionados con ácido cólico (gris oscuro: crecimiento sin inhibición; gris claro: inhibición parcial).

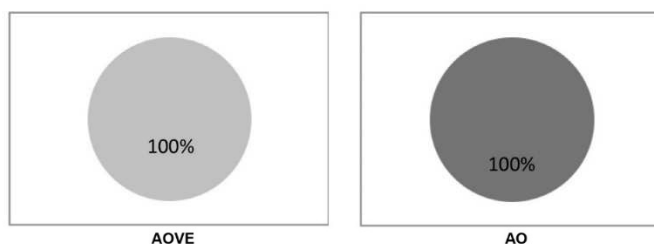


Figura 3: Porcentaje de cepas que presentaron crecimiento sin inhibición y con inhibición parcial tras el ensayo realizado con aceite de oliva virgen extra (AOVE) y aceite de oliva (AO) emulsionados con lecitina (gris oscuro: crecimiento sin inhibición; gris claro: inhibición parcial).

6. DISCUSIÓN

Los resultados presentados demuestran que existen diferencias en la microbiota intestinal de ratones alimentados con diferentes dietas ricas en grasas, incluida una dieta enriquecida en aceite de oliva refinado, frente a una dieta estándar, y muestran que estos cambios se correlacionan con ciertas variables fisiológicas.

El aceite de oliva, la grasa principal en la dieta mediterránea, se considera saludable desde hace mucho tiempo y recientemente se ha estudiado su influencia en la microbiota intestinal^{137, 138, 139}. Además, se han encontrado correlaciones entre el porcentaje de taxones bacterianos específicos y variables fisiológicas relacionadas con el síndrome metabólico^{140, 141}.

Considerando la diferente composición de la fracción insaponificable de distintos aceites de oliva, una comparación entre el aceite de oliva virgen y el refinado puede ayudarnos a comprender la responsabilidad de los polifenoles y otros componentes minoritarios en los efectos beneficiosos del aceite de oliva y la importancia de la microbiota intestinal en estos beneficios.

En este trabajo, hemos analizado los datos obtenidos de ratones alimentados con una dieta enriquecida en AOR en comparación con los ratones alimentados con una dieta enriquecida con AOVE o con M o una dieta ST.

¹³⁷Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter. *Food Res Int.* 2014; 64:553-559.

¹³⁸Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS One.* 2018; 13(1):e0190368.

¹³⁹Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, Stefanini L, Violi F, Carnevale R. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2018; 18(1):4-13.

¹⁴⁰Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS One.* 2018; 13(1):e0190368.

¹⁴¹Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. *Plant Foods Hum Nutr.* 2018; 73(1):1-6.

Se han evaluado las diferencias en porcentajes microbianos, así como en la fisiología del huésped y sus correlaciones. Después de doce semanas de dietas, diez familias bacterianas mostraron diferencias estadísticas significativas en el test Kruskal-Wallis¹⁴². En dos de ellas (*Prevotellaceae* y *Marinillabiliaceae*) hubo una marcada distinción entre la dieta estándar y las tres dietas altas en grasas.

En el caso de *Prevotellaceae*, hubo una significación ajustada entre los grupos ST y AOVE (la significación no ajustada de ST frente a las otras dos grasas también fue $<0,05^{143}$). Esta familia está relacionada con las dietas ricas en plantas con una alta ingesta de carbohidratos, fibra y vegetales¹⁴⁴, que se ajusta a los altos niveles detectados en ST, un alimento a base de grano, y con su correlación inversa significativa con el colesterol plasmático total, no presente en esta dieta.

Contrariamente a esto, en otras cinco familias — *Desulfovibrionaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Sutterellaceae*, *Spiroplasmataceae* y *Helicobacteraceae* — hubo diferencias entre las tres dietas altas en grasas.

Una de las más interesantes fue *Desulfovibrionaceae*, donde las comparaciones globales son significativas a pesar de que no se detectó la significación ajustada por pares, pero donde la significación no ajustada de AOVE-AOR mostró un valor p por debajo de 0,05¹⁴⁵.

¹⁴²Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁴³Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁴⁴Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon JI. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*. 2011; 333(6038):101-104.

¹⁴⁵Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

Como hemos discutido previamente¹⁴⁶, las *Desulfovibrionaceae* son bacterias reductoras de sulfato que podrían crecer gracias a las fuentes de sulfato presentes en la mantequilla, ya que se ha demostrado que el sulfato de condroitina, un suplemento dietético común de origen animal, estimula el crecimiento intestinal de *Desulfovibrio*¹⁴⁷ y, en algunos casos, se han relacionado con dietas altas en grasas derivadas de la leche^{148, 149}.

Según nuestro propio informe¹⁵⁰, esto podría explicar la alta presencia de este taxón bacteriano en el grupo alimentado con M en oposición al grupo AOVE, también una dieta alta en grasas.

Sin embargo, los altos niveles inesperados encontrados en AOR en el presente estudio delimitan más este escenario. Sin sulfatos de origen animal, se esperaba que esta familia se comportara en AOR como lo hace en la dieta AOVE, a menos que haya una fuente alternativa disponible de compuestos de azufre.

De hecho, el aceite de oliva virgen extra utilizado en este trabajo proviene de la agricultura ecológica, sin aditivos antes o después de la cosecha y, por lo tanto, no hay componentes externos, como compuestos de azufre.

¹⁴⁶Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹⁴⁷Rey FE, Gonzalez MD, Cheng J, Wu M, Ahern PP, Gordon JI. Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(33):13582-13587.

¹⁴⁸Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹⁴⁹Devkota S, Chang EB. Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. Dig Dis. 2015; 33(3):351-356.

¹⁵⁰Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

Por el contrario, los aceites de oliva refinados comerciales son stocks mixtos de diferentes orígenes y diferentes condiciones de cultivo y no se puede descartar la presencia de otros compuestos. Además de esto, el efecto de los polifenoles en los bajos niveles de *Desulfovibrionaceae* detectados en el AOVE tampoco puede descartarse.

Otro resultado interesante está relacionado con las correlaciones fisiológicas, ya que *Desulfovibrio* presenta una correlación positiva con la ingesta de alimentos, la ingesta de agua, la diuresis y el colesterol total¹⁵¹.

Spiroplasmataceae es otro caso notable, y lo es aún más porque pertenece al filo *Tenericutes*, también incrementado significativamente en el grupo AOR. Esta familia muestra diferencias significativas por pares entre AOR y ST y una significación no ajustada entre AOR y las otras dos dietas ricas en grasas (con AOVE $p < 0,05$ y con M $p < 0,1$).

A nivel de género, se han detectado varios géneros pertenecientes a esta familia, pero solo uno, el *Spiroplasma*, alcanza importancia¹⁵² *Spiroplasmataceae* se correlaciona altamente con el colesterol total¹⁵³, lo cual tiene sentido porque estas bacterias requieren colesterol para crecer ya que lo tienen en sus membranas celulares, pero no pueden sintetizarlo^{154, 155}.

¹⁵¹Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁵²Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁵³ Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁵⁴Freeman BA, Sissenstein R, McManus TT, Woodward JE, Lee IM, Mudd JB. Lipid composition and lipid metabolism of *Spiroplasma citri*. *J Bacteriol*. 1976; 125(3):946-954.

¹⁵⁵Shirley HY, Hung TA, Chen RF, Whitcomb JG, Tully YX. *Spiroplasma culicicola* sp. nov. from the Salt Marsh Mosquito *Aedes sollicitans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 1987; 37:365–370.

También requieren diferentes ácidos grasos: principalmente ácido palmítico, pero el ácido oleico también puede promover el crecimiento¹⁵⁶. Los bajos niveles detectados en el grupo AOVE pueden estar relacionados con los diferentes niveles estadísticamente significativos de colesterol total presentes en los dos grupos, pero el contenido de polifenoles también puede desempeñar un papel importante, ya que el hidroxitirosol y los polifenoles se han descrito como importantes antimicrobianos para *Tenericutes*^{157, 158}. En este caso, parece que el incremento en los taxones bacterianos no produce el cambio fisiológico, sino que es el cambio fisiológico el que produce el incremento bacteriano. Sin embargo, no se pueden descartar efectos adicionales no detectados de este incremento bacteriano y, por lo tanto, es importante tener en cuenta esta tendencia.

Hay otra familia con incrementos significativos inesperados en el grupo AOR, *Helicobacteraceae*, conformada por un solo género también significativo en este estudio, *Helicobacter*¹⁵⁹, y por una sola especie, más similar a *H. mastomyrinus*, una especie microaerófila enterohepática del tracto gastrointestinal superior¹⁶⁰, como son la mayoría de las especies de esta familia. Tanto la familia como el género están inversamente correlacionados con la leptina¹⁶¹, y es otro resultado que vale la pena tener en cuenta, donde los polifenoles parecen tener nuevamente un papel protector importante.

¹⁵⁶Freeman BA, Sissenstein R, McManus TT, Woodward JE, Lee IM, Mudd JB. Lipid composition and lipid metabolism of *Spiroplasma citri*. J Bacteriol. 1976; 125(3):946-954.

¹⁵⁷Musetti R, Favali MA, Pressacco L. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. Cytobios. 2000; 102(401):133-147.

¹⁵⁸Furneri PM, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(12):4892-4894.

¹⁵⁹Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. Microorganisms. 2019; 7(2):E61.

¹⁶⁰Shen Z, Xu S, Dewhirst FE, Paster BJ, Pena JA, Modlin IM, Kidd M, Fox JG. A novel enterohepatic *Helicobacter* species '*Helicobacter mastomyrinus*' isolated from the liver and intestine of rodents. Helicobacter. 2005; 10(1):59-70.

¹⁶¹Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. Microorganisms. 2019; 7(2):E61.

Las otras dos familias con distribución diferente entre los grupos AOR y AOVE son *Erysipelotrichaceae* y *Sutterellaceae*, donde, en oposición a los otros casos, el grupo AOVE muestra los valores más altos¹⁶². La primera familia se correlaciona inversamente con la insulina y la segunda, inversamente con la leptina¹⁶³, aunque el principal género significativo detectado en esta familia también se correlaciona inversamente con la insulina¹⁶⁴.

El vínculo del grupo AOVE con porcentajes bacterianos que se correlacionan con niveles bajos de insulina fue un resultado recurrente también en nuestro informe anterior¹⁶⁵ y, por lo tanto, los polifenoles son buenos candidatos para desempeñar un papel en este resultado.

Finalmente, dos familias están presentes en proporciones muy bajas, pero significativamente más altas en el grupo M que las otras: *Staphylococcaceae* y *Microbacteriaceae*¹⁶⁶. Estas dos familias son habitantes de la piel, capaces de sobrevivir fácilmente en el medio ambiente y están conformadas en este estudio por varios géneros y especies, y por lo tanto no descartamos un origen en la piel del ratón favorecido por la dieta enriquecida con M.

¹⁶²Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁶³Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁶⁴Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁶⁵Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS One*. 2018; 13(1):e0190368.

¹⁶⁶Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

Además de los géneros anteriores, hay seis adicionales que presentan diferencias significativas, pero cuyos taxones superiores no lo hacen¹⁶⁷. Estos son tres géneros que pertenecen al orden *Clostridiales* (*Ruminoclostridium*, *Fusicatenibacter* y *Desulfotomaculum*), dos *Proteobacterias* (*Marispirillum* y *Pantoea*) y un *Bacteroidales* (*Olivibacter*), ninguno de ellos con diferencias significativas ajustadas entre AOVE y AOR.

Vale la pena señalar el caso de *Desulfotomaculum* – otra bacteria reductora de sulfato que tiene una mayor presencia en M y AOR – como lo hace *Desulfovibrio*, aunque con una ligera disminución en AOR con respecto a M que coincide con la pérdida de correlación con el colesterol total.

Con respecto a los géneros de *Proteobacterias*, los cinco detectados pertenecen a los cinco linajes de proteobacterias descritos (α , β , γ , δ y ϵ -*Proteobacteria*) y todos ellos están presentes en una proporción más alta en una de las dietas altas en grasas.

Esto refuerza la hipótesis que relaciona este taxón bacteriano con grasas^{168, 169} y con endotoxemia metabólica inducida por LPS¹⁷⁰.

¹⁶⁷Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms*. 2019; 7(2):E61.

¹⁶⁸Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS One*. 2018; 13(1):e0190368.

¹⁶⁹Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009; 137(5):1716-1724.e1-2.

¹⁷⁰Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(7):1761-1772.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en nuestros resultados actuales y en los anteriores¹⁷¹, los ratones alimentados con AOVE presentan porcentajes más altos solamente en una β -Proteobacteria, *Parasutterella* (fam. Sutterellaceae), que no muestra ninguno de estos resultados, correlacionando con niveles más bajos de leptina, insulina y HDL/LDL.

Como se indicó anteriormente, la correlación no implica necesariamente causalidad y el hecho de descubrir dos variables que evolucionan en paralelo no indica automáticamente que una sea la causa de la otra. En el caso del presente estudio, se ha probado que una serie de variables fisiológicas modifican sus valores en relación con la presencia de ciertos taxones bacterianos, pero hay que realizar más trabajo, principalmente en modelos murinos gnotobióticos controlados, para mostrar de forma indudable la extensión de la responsabilidad de la microbiota en esos efectos. Los resultados aquí presentados delimitan el escenario para estos futuros experimentos.

Con respecto al tercer objetivo, caracterización de diferentes grupos bacterianos intestinales, nuestros esfuerzos se concentraron en bacterias del ácido láctico (BAL) y en la detección de metanógenas, ambas a partir de la mucosa de intestino grueso de los ratones.

Las bacterias del ácido láctico fueron primero estudiadas *in silico* a partir de secuencias obtenidas, tanto las ya publicadas^{172, 173} como las que no lo están aún.

¹⁷¹Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹⁷²Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018; 13(1):e0190368.

¹⁷³Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. Microorganisms. 2019; 7(2):E61.

El análisis estadístico había mostrado de manera significativa que las BAL de la familia *Lactobacillaceae* estaban en mayor número que el resto de familias BAL en ratones alimentados con dieta estándar, tanto en el balance intermedio como en el final del experimento, y que además las *Lactobacillaceae* mostraban un descenso significativo de las seis a las doce semanas.

Este resultado, aun cuando está realizado en un número limitado de ratones y es muy preliminar, apunta al hecho ya publicado en varias ocasiones que presenta una disminución de las bacterias del ácido láctico con la edad^{174, 175}. Sería interesante realizar más estudios en este sentido.

Por otro lado, y por razones enmarcadas en el transcurso de la investigación¹⁷⁶, llevamos a cabo un intento de aislamiento de bacterias lácticas a partir de la mucosa de intestino grueso de dos ratones alimentados con aceite de oliva virgen extra.

Tras el aislamiento de las colonias en medio selectivo y atmósfera anaeróbica, tinción de Gram y pruebas bioquímicas pertinentes, se aislaron 10 cepas diferentes con morfología bacilar o de coco-bacilo y que, tras secuenciar el gen ribosómico 16S, parecen enmarcadas en dos especies diferentes, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus murinus*. Ninguna de estas cepas mostró producir aminas biógenas y sólo dos produjeron un halo antimicrobiano muy limitado frente a *Staphylococcus aureus* en medio MRS tamponado.

Nuestro estudio utilizando microscopio confocal nos volvió a confirmar la idoneidad del uso de la autofluorescencia de las metanógenas para poner de manifiesto la presencia de este grupo en el microbioma intestinal. Sin embargo, no volvimos a repetir los resultados que habíamos obtenido previamente.

¹⁷⁴Mikelsaar M, Sepp E, Štšepetova J, Songisepp E, Mändar R. Biodiversity of Intestinal Lactic Acid Bacteria in the Healthy Population. Adv Exp Med Biol. 2016; 932:1-64.

¹⁷⁵Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiol. 2009; 9:123.

¹⁷⁶Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. Plant Foods Hum Nutr. 2018; 73(1):1-6.

Para comprobar si estas diferencias pudieron ser debidas al tiempo transcurrido entre un ensayo y otro, y después de cerciorarnos de que las muestras analizadas en primer lugar seguían manteniendo un recuento similar al observado anteriormente, decidimos buscar correlaciones entre la fluorescencia observada en las muestras y otros valores, tanto fisiológicos como en porcentaje de taxones bacterianos, presentados por los mismos ratones. De esta manera, esperábamos encontrar algunas pistas que nos indicaran cual había sido el problema.

Como se ha indicado anteriormente, en estos análisis se obtuvo buena correlación ($R=0,73$), con significación al 95%, con los datos de colesterol total. La relación del nivel de presencia de metanógenas intestinales con el colesterol total y/o con la obesidad no es nuevo y ha sido publicado por varios autores^{177, 178}.

Con respecto a los grupos taxonómicos, el recuento de metanógenas se comparó con los datos de presencia de 82 familias bacterianas, obteniéndose buena correlación significativa al 95% con *Haloplasmataceae* ($R=0,69$) y *Desulfonatronumaceae* ($R=0,74$). También hubo correlación significativa con *Bifidobacteriaceae* y *Acidimicrobiaceae*, pero con un coeficiente de correlación mucho menor (0,58 y 0,49 respectivamente) por los que estas dos últimas no se considerarán en nuestra discusión.

Los otros dos grupos microbianos tienen en común el ser halófilos, anaerobios y de ambientes extremos. A raíz de esto, buscamos si había otros halófilos en nuestra base de datos y en efecto pudimos encontrar otras dos familias (*Desulfohalobiaceae* y *Halomomadaceae*), que son halófilas moderadas y cuya presencia se limita a un solo ratón respectivamente por lo hubiese sido imposible, en cualquier caso, encontrar ninguna correlación con ellas.

¹⁷⁷Mathur R, Mundi MS, Chua KS, Lorentz PA, Barlow GM, Lin E, Burch M, Youdim A, Pimentel M. Intestinal methane production is associated with decreased weight loss following bariatric surgery. *Obes Res Clin Pract.* 2016; 10(6):728-733.

¹⁷⁸Laverdure R, Mezouari A, Carson MA, Basiliro N, Gagnon J. A role for methanogens and methane in the regulation of GLP-1. *Endocrinol Diabetes Metab.* 2017; 1(1):e00006.

Estos resultados nos hicieron pensar que las diferencias encontradas entre nuestros datos y los obtenidos anteriormente no se debían, al menos en su mayor parte, al hecho de haber realizado el estudio separado por un margen de tiempo, sino que debía existir un factor, independientemente de este hecho, que afectase de manera común a estas familias de procariotas adaptadas a ambientes alejados de la normalidad. Por ello intentamos buscar características comunes entre las tres familias.

Desulfonatronumaceae son delta-proteobacterias, reductoras de sulfato y aisladas de ambientes alcalófilos. Son lithoheterótrofos pero también litoautótrofos facultativos, capaces de vivir a base de H^+ y sin una fuente de carbono. Usan sulfatos, sulfitos y tiosulfatos como último aceptor de electrones. Miembros de esta familia se han aislado de los sedimentos alcalinos del lago Mono, California¹⁷⁹.

Por su parte, *Haloplasmataceae* es una familia dentro del orden *Haloplasmales*, que actualmente incluye un solo género y especie: *Haloplasma contractile*. Esta familia tiene características fenotípicas inusuales, la más notable es una morfología única, sin pared celular, crecimiento en forma de huevo frito, y una posición filogenética a medio camino entre los *Firmicutes* y los *Tenericutes* (o *Mollicutes*).

Los miembros de *Haloplasmataceae* se han aislado de los sedimentos de una salmuera anóxica de aguas profundas en el Mar Rojo¹⁸⁰, pero los estudios independientes de cultivo han encontrado secuencias relacionadas en una amplia gama de biotopos, incluidos otros ambientes extremos, suelos contaminados y sedimentos marinos, así como muestras intestinales. Este organismo es estrictamente anaerobio y halófilo y tiene una temperatura óptima para el crecimiento de aproximadamente 30 a 37 grados C y un pH óptimo de aproximadamente 7. Usan el nitrato y el nitrito como aceptor último de electrones.

¹⁷⁹Pikuta EV, Hoover RB, Bej AK, Marsic D, Whitman WB, Cleland D, Krader P. *Desulfonatronum thiodismutans* sp. nov., a novel alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium capable of lithoautotrophic growth. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(Pt 5):1327-1332.

¹⁸⁰Antunes A, Rainey FA, Wanner G, Taborda M, Pätzold J, Nobre MF, da Costa MS, Huber R. A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. J Bacteriol. 2008; 190(10):3580-3587.

Nuestras metanógenas tienen algo importante en común con estas dos familias con las que correlacionan: son grupos típicos de sedimentos con ambientes muy reductores, estrictamente anaerobias, y que además funcionan como sumidero de H^+ . Puede que incluso compartan el hecho de ser halófilas, ya que hay un grupo de metanógenas que también lo son, pero esto no parece esencial.

Estas características encajan perfectamente con lo observado en la dieta alta en mantequilla. Los ratones alimentados con mantequilla tenían acumulo de bolo fecal en los intestinos y las heces eran más compactas, en menor número y de mayor tamaño, es decir, tanto en los intestinos como en las heces era más fácil que se establecieran condiciones altamente reductoras en el centro de la matriz.

Pudiera ser que los tres ratones que presentan mayor número de metanógenas tuvieran estas mismas condiciones en mayor medida. ¿Por qué esos tres ratones se cogieron para el DGGE? Si presentaban las heces más compactas y voluminosas, era más fácil elegir las para obtener suficiente masa y de esa manera obtener suficiente ADN para el DGGE. No es descabellado pensar que por ello y de manera inconsciente se escogieran las muestras con heces de mayor tamaño.

Si esto es así, sería importante comprobar si las dietas altas en grasas saturadas pueden, bajo ciertas condiciones, producir ambientes altamente reductores en el intestino que favorezcan el crecimiento de especies bacterianas y de arqueas como sumideros de H^+ , y las consecuencias que esto puede conllevar para la salud del hospedador.

Finalmente, y enmarcado en el cuarto y último objetivo de esta memoria, se llevó a cabo un estudio comparativo del efecto antimicrobiano del aceite de oliva virgen extra y refinado sobre una colección de 131 enterococos aislados a partir de alimentos y de muestras ambientales. Para ello se utilizaron tres tipos de ensayos: con papel de filtro, con ácido cólico y con lecitina.

El resultado fue el mismo en todos los casos, observándose inhibición parcial sólo en los ensayos con aceite de oliva virgen extra, mientras que el aceite de oliva refinado no producía ningún tipo de inhibición, creciendo las cepas con una intensidad comparable al control.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que existe una clara diferencia entre el aceite de oliva y el virgen extra en cuanto sus propiedades antimicrobianas sobre el género *Enterococcus*, siendo el aceite de oliva virgen el único que ha demostrado poseer capacidad bacteriostática/bactericida frente a todas las cepas de la colección bacteriana de este género aisladas por nosotros a partir de distintos alimentos y muestras ambientales.

Como se ha comentado en resultados, se conoce una alta capacidad bactericida *in vitro* por parte del aceite de oliva hacia bacterias entéricas patógenas como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*, y contra bacterias entéricas beneficiosas como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*. Las cepas *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Bacteroides vulgatus* mostraron una alta sensibilidad al hidroxitirosol, mientras que las especies *Clostridium perfringens*, *Clostridium clostridiforme* y *Enterococcus faecalis* mostraron una sensibilidad moderada o no se observó¹⁸¹.

Se ha imputado la capacidad bactericida del AOVE a sus polifenoles. Sin embargo, estudios anteriores tampoco habían verificado la capacidad bactericida de distintos componentes del aceite de oliva (hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína) frente a la especie *Enterococcus faecalis*¹⁸². Incluso fue analizada la capacidad bactericida de componentes de diferentes tipos de aceite de origen vegetal, revelando un efecto nulo sobre las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*¹⁸³.

Sin embargo, todos estos estudios están llevados a cabo solo en sendas cepas representantes de ambas especies. Si nuestro estudio se hubiese hecho con el 2% de cepas que presentaron crecimiento normal con aceite de oliva virgen en el ensayo del filtro, también hubiésemos obtenido el mismo resultado que Medina y colaboradores.

¹⁸¹Brenes M, Medina E, García A, Romero C, Castro A. Olives and Olive Oil Compounds Active Against Pathogenic Microorganisms, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Elsevier, United States of America. 2010; 109:1013-1019.

¹⁸²Medina E, Brenes M, García A, Romero C, de Castro A. Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. J Food Prot. 2009; 72:2611-2614.

¹⁸³Medina E, Brenes M, García A, Romero C, de Castro A. Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. J Food Prot. 2009; 72:2611-2614.

De hecho, otro experimento realizado en nuestro laboratorio, muestra que el origen de las cepas de enterococos en cuanto a la dieta del hospedador si es de origen fecal, afecta a la capacidad de resistir la capacidad antimicrobiana de las grasas¹⁸⁴. El valor de nuestro estudio radica por tanto en la gran cantidad de cepas de enterococos estudiadas.

En conclusión, aunque ya anteriormente en nuestro laboratorio habíamos demostrado que el aceite de oliva virgen extra no aumenta la cantidad global de otros taxones oportunistas, al contrario de lo que ocurre con la dieta alta en mantequilla, en este estudio hemos corroborado que el AOVE mantiene inalterados estos grupos microbianos perjudiciales por lo que contribuye de manera esencial al mantenimiento de la salud del hospedador. Al tratarse el aceite de oliva virgen extra de una grasa principalmente monoinsaturada, cabía la posibilidad de que fuera esta característica (la presencia de ácidos grasos monoinsaturados frente a los saturados de la mantequilla) la que diera lugar al resultado anteriormente descrito. Por ello en esta ocasión hemos incluido en el estudio también una dieta con aceite de oliva refinado, que mantiene una composición lipídica muy similar al AOVE pero que está desprovisto del resto de componentes insaponificables como son principalmente los polifenoles y otros componentes minoritarios. Nuestros resultados y esta discusión muestran que los ratones alimentados con el aceite refinado tienen un perfil microbiano distintivo, pero mucho más similar al de la mantequilla. Este comportamiento del refinado, nos hace pensar que los polifenoles tienen mucha responsabilidad en controlar estas bacterias oportunistas.

Al igual que ocurre con otros muchos alimentos vegetales, la actividad antimicrobiana de los polifenoles presentes parece ser capaz de seleccionar aquellos grupos microbianos más adaptados a nuestra fisiología. Y, por tanto, sería el aceite de oliva virgen, como grasa principal de la Dieta Mediterránea, el encargado primordial de modular el crecimiento de estos grupos microbianos intestinales, de manera que se mantenga una condición de eubiosis, la misma eubiosis que ha evolucionado con nosotros durante siglos para dar lugar a una fisiología digestiva equilibrada y saludable.

¹⁸⁴Sánchez B, Cobo A, Hidalgo M, Martínez-Rodríguez AM, Prieto I, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in *Enterococci* Isolated from Faeces in Mice. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(17):E4290.

7. CONCLUSIONES

1. Hemos detectado cinco familias bacterianas que presentan diferencias significativas en porcentajes de presencia de secuencias del gen r16S entre ratones alimentados con aceite de oliva virgen y refinado en un estudio metagenómico: *Desulfovibrionaceae*, *Spiroplasmataceae*, *Helicobacteraceae*, *Erysipelotrichaceae* y *Sutterellaceae*.
2. En cuanto al efecto de los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen extra, en tres de estas familias (*Desulfovibrionaceae*, *Spiroplasmataceae* y *Helicobacteraceae*), los polifenoles de aceite de oliva virgen extra y/u otros componentes minoritarios podrían contribuir a evitar que las bacterias indeseables alcancen los niveles obtenidos en la dieta AOR. En otras dos familias (*Erysipelotrichaceae* y *Sutterellaceae*), los polifenoles pueden actuar indirectamente para promover el incremento de sus porcentajes con resultados que aún no se han dilucidado por completo. Otra familia bacteriana prevalente, *Prevotellaceae*, no parece verse afectada por la fracción insaponificable, al menos de manera aparente, mostrando el mismo comportamiento en las tres dietas ricas en grasas, independientemente de su composición.
3. Dos de las familias que presentan diferentes porcentajes en ratones alimentados con cada una de las dos dietas – *Desulfovibrionaceae* y *Spiroplasmataceae* – correlacionan con los niveles de colesterol total. En el caso de *Helicobacteraceae* y *Sutterellaceae*, se ha encontrado una correlación inversa con la leptina. Por último, *Erysipelotrichaceae* correlaciona inversamente con la insulina.
4. En ratones alimentados con pienso estándar, existen diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de la familia *Lactobacillaceae* y el resto de familias de bacterias del ácido láctico a las 0, 6 y 12 semanas de dieta, siendo las primeras más preponderantes en todos los casos. El porcentaje de secuencias del gen 16S correspondientes a esta familia sufre un descenso estadísticamente significativo entre las 6 y las 12 semanas de dieta (12 y 18 semanas de vida de los ratones).
5. El recuento de fluorescencia a 420 nm en microscopio confocal muestra ser compatible con la presencia de metanógenas y, globalmente, correlaciona positivamente con los niveles de colesterol total y con el porcentaje de

secuencias del gen r16S de las familias *Desulfonatronumaceae* y *Haloplasmataceae*.

6. En una colección de cepas de enterococos aisladas de alimentos y ambientales, y usando tres métodos diferentes, el aceite de oliva virgen extra produce la inhibición parcial del crecimiento en las cepas bacterianas de *Enterococcus* de la colección, frente al efecto producido por aceite de oliva refinado, que no posee ninguna actividad antimicrobiana, favoreciendo de hecho el crecimiento de la inmensa mayoría de los aislados.

8. REFERENCIAS

Albenberg LG, Wu GD. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*. 2014; 146(6):1564-1572.

Amarowicz R, Carle R, Dongowski G, Durazzo A, Galensa R, Kammerer D, Maiani G, Piskula MK. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53 Suppl 2:S151-183.

Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, Garofalo C, Moine Q, Desjardins Y, Levy E, Marette A. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia spp.* population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015; 64(6):872-883.

Anhê FF, Varin TV, Le Barz M, Desjardins Y, Levy E, Roy D, Marette A. Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts. *Curr Obes Rep*. 2015; 4(4):389-400.

Antunes A, Rainey FA, Wanner G, Taborda M, Pätzold J, Nobre MF, da Costa MS, Huber R. A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. *J Bacteriol*. 2008; 190(10):3580-3587.

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473(7346):174-180.

Babio N, Bulló M, Basora J, Martínez-González MA, Fernández-Ballart J, Márquez-Sandoval F, Molina C, Salas-Salvadó J; Nureta-PREDIMED Investigators. Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009; 19(8):563-570.

Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Duran R, Luna Jde D, Segarra AB, Hermoso F, Ramírez M. Asymmetrical response of aminopeptidase A and nitric oxide in plasma of normotensive and hypertensive rats with experimental hemiparkinsonism. *Neuropharmacology*. 2009; 56(3):573-579.

Bernardini E, Visioli F. High quality, good health: The case for olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2017; 119(1):Olive Oil 1500505.

Berry EM, Arnoni Y, Aviram M. The Middle Eastern and biblical origins of the Mediterranean diet. *Public Health Nutr*. 2011; 14(12A):2288-2295.

Boskou D. Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. AOCS Press, Urbana, IL, USA. 2015.

Brenes M, Medina E, García A, Romero C, Castro A. Olives and Olive Oil Compounds Active Against Pathogenic Microorganisms, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Elsevier, United States of America. 2010; 109:1013-1019.

Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*. 2012; 4(8):1095-1119.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(7):1761-1772.

Casas R, Estruch R, Sacanella E. The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-mediated Inflammatory Responses. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18(1):23-35.

Castro-Barquero S, Lamuela-Raventós RM, Doménech M, Estruch R. Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity. *Nutrients*. 2018; 10(10): E1523.

Cebrián R, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol*. 2012; 30(1):59-67.

Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RS. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009; 49(3):218-236.

Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol*. 2012; 23(2):129-135.

Codex Alimentarius CL 1993/35-FO. CODEX STAN 33-1981.

Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 2019.

Corona G, Spencer JP, Dessì MA. Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25(4-5):285-293.

Covas MI, de la Torre R, Fitó M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *Br J Nutr*. 2015; 113 Suppl 2:S19-28.

Covas MI, Fitó M, De la Torre R. in *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. AOCS Press. 2015; 31–52.

de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C, de Vogel-van den Bosch J, Kleerebezem M, Müller M, van der Meer R. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012; 303(5):G589-599.

Deiana M, Serra G, Corona G. Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. *Food Funct*. 2018; 9(8):4085-4099.

Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(14):1818–1892.

Devkota S, Chang EB. Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis*. 2015; 33(3):351-356.

Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R. *Enterococcus*, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. *Rev Cubana Hig Epidemiol. Ciudad de la Habana*. 2013; 51(1).

Dicksved J. Exploring the human intestinal microbiome in health and disease. Dissertation, Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae 2008:30. Uppsala. https://pub.epsilon.slu.se/1760/1/Dicksved_Thesis_Kappan.pdf [Accessed 26 Dec 2019].

Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: A review. *Eur J Nutr*. 2015; 54(3):325-341.

Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon JI. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*. 2011; 333(6038):101-104.

Farinetti A, Zurlo V, Manenti A, Coppi F, Mattioli AV. Mediterranean diet and colorectal cancer: A systematic review. *Nutrition*. 2017; 43-44:83-88.

Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37(2):216-223.

Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. *Enterococci* in foods--a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol*. 2003; 88(2-3):105-122.

- Freeman BA, Sissenstein R, McManus TT, Woodward JE, Lee IM, Mudd JB. Lipid composition and lipid metabolism of *Spiroplasma citri*. J Bacteriol. 1976; 125(3):946-954.
- Furneri PM, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(12):4892-4894.
- Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère JF. *Archaea* and the human gut: new beginning of an old story. World J Gastroenterol. 2014; 20(43):16062-16078.
- Gillingham LG, Harris-Janz S, Jones PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. Lipids. 2011; 46(3):209-228.
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols, Int. Int J Mol Sci. 2018; 19(3).
- Gotsis E, Anagnostis P, Mariolis A, Vlachou A, Katsiki N, Karagiannis A. Health benefits of the Mediterranean Diet: an update of research over the last 5 years. Angiology. 2015; 66(4):304-318.
- Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against Aβ plaque pathology. PLoS One. 2013; 8(8):e71702.
- Harwood J, Aparicio R. Handbook of olive oil, Analysis and Properties. Kluwer Academic Publishers J.L. Harwood, R. Aparicio. 2000.
- Harwood L, Yaqoob P. Nutritional and health aspects of olive oil. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002; 104: 685–697.
- Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 541-591.
- Hidalgo M. Estudio de la influencia del aceite de oliva sobre la microbiota del tracto gastrointestinal de roedores. Tesis doctoral. Universidad de Jaén. 2015.

Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut Microbiota. Comparison to butter. *Food Res Int.* 2014; 64:553-559.

Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. *Plant Foods Hum Nutr.* 2018; 73(1):1-6.

Hidalgo M, Prieto I, Martínez-Cañamero M. Dieta rica en Aceite de Oliva Virgen Extra y Microbiota Intestinal. *Aldaba.* 2018; 43:101-110.

Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology.* 2009; 137(5):1716-1724.e1-2.

Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001; 292(5519):1115-1118.

Huang CW, Chien YS, Chen YJ, Ajuwon KM, Mersmann HM, Ding ST. Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10): E1689.

Informe del Consumo de Alimentación en España 2016. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Servicio de Publicaciones del MAPAMA. Madrid, España. 2017.

Jose PA, Raj D. Gut microbiota in hypertension. *Curr Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015; 24(5):403-409.

Kaulmann A, Bohn T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases-Promises, Perspectives, and Pitfalls. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 9346-9470.

Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. PLoS One. 2012; 7(10):e47713.

Kumar P, Periyasamy R, Das S, Neerukonda S, Mani I, Pandey KN. All-trans retinoic acid and sodium butyrate enhance natriuretic peptide receptor a gene transcription: role of histone modification. Mol Pharmacol. 2014; 85(6):946-957.

Laverdure R, Mezouari A, Carson MA, Basiliko N, Gagnon J. A role for methanogens and methane in the regulation of GLP-1. Endocrinol Diabetes Metab. 2017; 1(1):e00006.

Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Philippe C, Walker F, Bado A, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. Gut. 2013; 62(12):1787-1794.

Leone A, Romaniello R, Peri G, Tamborrino A. Development of a new model of olives de-stoner machine: Evaluation of electric consumption and kernel characterization. Biomass and Bioenergy. 2015; 81:108-116.

Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S. Food groups and colorectal cancer risk. Br J Cancer. 1999; 79(7-8):1283–1287.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 2006; 444(7122):1022-1023.

Liu MY, Xydakis AM, Hoogeveen RC, Jones PH, Smith EO, Nelson KW, Ballantyne CM. Multiplexed analysis of biomarkers related to obesity and the metabolic syndrome in human plasma, using the Luminex-100 system. Clin Chem. 2005; 51(7):1102-1109.

Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal *Clostridia*: leading players in the maintenance of gut homeostasis. Gut Pathog. 2013; 5(1):23.

Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiol. 2009; 9:123.

Martínez I, Wallace G, Zhang C, Legge R, Benson AK, Carr TP, Moriyama EN, Walter J. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(12):4175-4184.

Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms.* 2019; 7(2): E61.

Martínez-Cañamero M, Segarra AB, Hidalgo M, Villarejo AB, Abriouel H, Navas J, Gálvez A, Ramírez M, Prieto I. Efecto de la ingesta de aceites de oliva con distinto contenido en polifenoles sobre la microbiota gastrointestinal. Relación con el síndrome metabólico. "Proyectos de Investigación 2010-2011", Universidad de Jaén. 2013; 46-76.

Martínez-González MA, García-Arellano A, Toledo E, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, Covas MI, Schröder H, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Ruiz-Gutiérrez V, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Muñoz MA, Wärnberg J, Ros E, Estruch R; PREDIMED Study Investigators. A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One.* 2012; 7(8):e43134.

Martínez-González MÁ, Martín-Calvo N. The major European dietary patterns and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013; 14(3):265-271.

Martín-Peláez S, Covas MI, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57(5):760-771.

Martín-Peláez S, Mosele JI, Pizarro N, Farràs M, de la Torre R, Subirana I, Pérez-Cano FJ, Castañer O, Solà R, Fernandez-Castillejo S, Heredia S, Farré M, Motilva MJ, Fitó M. Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. *Eur J Nutr.* 2017; 56(1):119-131.

Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Characterization and safety evaluation of *enterococci* isolated from Spanish goats' milk cheeses. Int J Food Microbiol. 2009; 132(1):24-32.

Mathur R, Mundi MS, Chua KS, Lorentz PA, Barlow GM, Lin E, Burch M, Youdim A, Pimentel M. Intestinal methane production is associated with decreased weight loss following bariatric surgery. Obes Res Clin Pract. 2016; 10(6):728-733.

Medina E, Brenes M, García A, Romero C, de Castro A. Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. J Food Prot. 2009; 72(12):2611-2614.

Medina E, Brenes M, Romero C, García A, de Castro A. Main antimicrobial compounds in table olives. J Agric Food Chem. 2007; 55(24):9817-9823.

Medina E, de Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. J Agric Food Chem. 2006; 54(14):4954-4961.

Mikelsaar M, Sepp E, Štšepetova J, Songisepp E, Mändar R. Biodiversity of Intestinal Lactic Acid Bacteria in the Healthy Population. Adv Exp Med Biol. 2016; 932:1-64.

Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R, Raccach D, Vialettes B, Raoult D. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. Int J Obes (Lond). 2012; 36(6):817-825.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2019.

Morales-Hervás L, Cobo-Molinos A, Martínez-Cañamero M. Efecto del aceite de oliva virgen y sobre cepas bacterianas aisladas de alimentos y ambientales. Memoria de Trabajo Fin de Grado. Universidad de Jaén. 2015.

Musetti R, Favali MA, Pressacco L. Histopathology and polyphenol content in plants infected by *phytoplasmas*. Cytobios. 2000; 102(401):133-147.

Neyrinck AM, Possemiers S, Verstraete W, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. 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. *J Nutr Biochem*. 2012; 23(1):51-59.

Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Br J Nutr*. 2013; 109(5):802-809.

Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, Stefanini L, Violi F, Carnevale R. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18(1):4-13.

Olive Council, T.15/NC No 3/Rev. 8. 2015.

Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 2010; 78(2):133-154.

Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38(8):647-659.

Pacheco YM, López S, Bermúdez B, Abia R, Muriana FJ. Extra-virgin vs. refined olive oil on postprandial hemostatic markers in healthy subjects. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(6):1421-1422.

Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Lista J, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des*. 2011; 17(8):769-777.

Perin LM, Miranda RO, Todorov SD, Franco BD, Nero LA. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic *lactococci* and *enterococci* isolated from goat milk. *Int J Food Microbiol*. 2014; 185:121-126.

Pikuta EV, Hoover RB, Bej AK, Marsic D, Whitman WB, Cleland D, Krader P. *Desulfonatratronum thiodismutans* sp. nov., a novel alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium capable of lithoautotrophic growth. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53(Pt 5):1327-1332.

Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res*. 2011; 50(4):372-387.

Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS One*. 2018; 13(1):e0190368.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464(7285):59-65.

Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J. Nutr*. 1999; 129:2177–2183.

Ranuh R, Athiyyah AF, Darma A, Risky VP, Riawan W, Surono IS, Sudarmo SM. Effect of the probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506 on BDNF and 5HT stimulation: role of intestinal microbiota on the gut-brain axis. *Iran J Microbiol*. 2019; 11(2):145-150.

Rey FE, Gonzalez MD, Cheng J, Wu M, Ahern PP, Gordon JI. Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(33):13582-13587.

- Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. Clin Nutr. 2004; 23(4):447-456.
- Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. Int J Mol Sci. 2016; 17(6).
- Roopchand DE, Carmody RN, Kuhn P, Moskal K, Rojas-Silva P, Turnbaugh PJ, Raskin I. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. Diabetes. 2015; 64(8):2847-2858.
- Saarela M, Lähteenmäki L, Crittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. Gut bacteria and health foods - the European perspective. Int J Food Microbiol. 2002; 78(1-2):99-117.
- Saffrey MJ. Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system. Age. 2014; 36(3):1910-1032.
- Sánchez B, Cobo A, Hidalgo M, Martínez-Rodríguez AM, Prieto I, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in *Enterococci* Isolated from Faeces in Mice. Int J Mol Sci. 2019; 20(17): E4290.
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, De Sanctis P, Giovannini C, D'Archivio M, Masella R. Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases? Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2018; 18(1):36-50.
- Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol. 1989; 55(8):1901-1906.
- Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. Pharmacol Res. 2013; 69(1):52-60.
- Segarra AB, Ramirez M, Banegas I, Alba F, Vives F, Gasparo Md, Ortega E, Ruiz E, Prieto I. Dietary fat influences testosterone, cholesterol, aminopeptidase A, and blood pressure in male rats. Horm Metab Res. 2008; 40(4):289-291.

Segarra AB, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, Ramírez-Sánchez M, de Gasparo M, Banegas I, Martínez-Cañamero M, Vives F, Prieto I. The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities. *Horm Metab Res.* 2011; 43(2):86-91.

Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med.* 2013; 34:(1):39-58.

Shen Z, Xu S, Dewhirst FE, Paster BJ, Pena JA, Modlin IM, Kidd M, Fox JG. A novel enterohepatic *Helicobacter* species '*Helicobacter mastomyrinus*' isolated from the liver and intestine of rodents. *Helicobacter.* 2005; 10(1):59-70.

Shirley HY, Hung TA, Chen RF, Whitcomb JG, Tully YX. *Spiroplasma culicicola* sp. nov. from the Salt Marsh Mosquito *Aedes sollicitans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1987; 37:365–370.

Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Methods.* 1999; 36(3):167-179.

Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J Epidemiol Community Health.* 2000; 54(10):756-760.

Sunkara T, Rawla P, Ofosu A, Gaduputi V. Fecal microbiota transplant - A new frontier in inflammatory bowel disease. *J Inflamm Res.* 2018; 11:321-328.

UNESCO Inscribed in 2013 (8.COM) on the Representative List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity. Available from: <https://ich.unesco.org/en/RL/mediterranean-diet-00884> [Accessed December 26, 19].

Vázquez-Araújo L, Adhikari K, Chambers E 4th, Chambers DH, Carbonell-Barrachina AA. Cross-cultural perception of six commercial olive oils: A study with Spanish and US consumers. *Food Sci Technol Int.* 2015; 21(6):454-466.

Vekiari SA, Papadopoulou P, Koutsaftakis A. Comparison of different olive oil extraction systems and the effect of storage conditions on the quality of the virgin olive oil. *Grasas y Aceites*. 2002; 53(3):324-329.

Villarejo AB, Prieto I, Segarra AB, Banegas I, Wangensteen R, Vives F, de Gasparo M, Ramírez-Sánchez M. Relationship of angiotensinase and vasopressinase activities between hypothalamus, heart, and plasma in L-NAME-treated WKY and SHR. *Horm Metab Res*. 2014; 46(8):561-567.

Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Segarra AB, Martínez-Cañamero M, Prieto I. Influence of extra virgin olive oil on blood pressure and kidney angiotensinase activities in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med*. 2015; 81(8):664-669.

Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*. 2002; 22(1):65-75.

Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*. 2007; 12(4):331-342.

Williams PT, Fortmann SP, Terry RB, Garay SC, Vranizan KM, Ellsworth N, Wood PD. Associations of dietary fat, regional adiposity, and blood pressure in men. *JAMA*. 1987; 257(23):3251-3256.

Wu GD, Lewis JD. Analysis of the human gut microbiome and association with disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11(7):774-777.

Ye X, Scott T, Gao X, Maras JE, Bakun PJ, Tucker KL. Mediterranean diet, healthy eating index 2005, and cognitive function in middle-aged and older Puerto Rican adults. *J Acad Nutr Diet*. 2013; 113(2):276-281.e1-3.

Zarrati M, Shidfar F, Nourijelyani K, Mofid V, Hossein zadeh-Attar MJ, Bidad K, Najafi F, Gheflati Z, Chamari M, Salehi E. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *Biofactors*. 2013; 39(6):633-643.

Referencias

Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. ISME J. 2010; 4(2):232-241.