



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Funcional y Molecular

TESIS DOCTORAL

**Relación de la dieta con la microbiota intestinal,
marcadores de estrés oxidativo y parámetros
inmunológicos, en distintos grupos de población.**

Adriana Cuervo Coque

Oviedo, 2014



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Relación de la dieta con la microbiota intestinal, marcadores de estrés oxidativo y parámetros inmunológicos, en distintos grupos de población.	Inglés: Relation between the diet, intestinal microbiota, markers of oxidative stress and immunological parameters, in different population groups.
2.- Autor	
Nombre: Adriana Cuervo Coque	DNI/Pasaporte/NIE: _____
Programa de Doctorado: Biología Funcional y Molecular	
Órgano responsable: Departamento de Biología Funcional	

RESUMEN (en español)

A lo largo de las últimas décadas se han ido acumulando evidencias científicas que ponen de manifiesto la estrecha relación entre la dieta y el sistema inmune. Así, mientras el papel de algunas vitaminas, minerales y ácidos grasos poliinsaturados (AGP) ha sido ampliamente estudiado, el de otros componentes, como los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) o los polifenoles, ha recibido menos atención. Los avances más novedosos en este campo sugieren que la microbiota intestinal podría jugar un papel importante en esta asociación entre la dieta y el estado inmunológico, lo que ha propiciado el desarrollo de estrategias dietéticas dirigidas a actuar sobre la salud a través de la modulación de estas poblaciones bacterianas. En este sentido, el estudio de los pro y prebióticos ha recibido mucha atención en los últimos años, sin embargo, son escasos los trabajos que evalúan el efecto que ejerce la dieta habitual sobre este ecosistema. Por ello, planteamos la hipótesis de que de que la dieta habitual desempeña su efecto sobre la salud a través de diversos mecanismos que incluyen la influencia sobre el sistema inmune, la repercusión sobre el estrés oxidativo y la modulación de la composición de la microbiota intestinal de los sujetos. Se ha sugerido que el estudio de esta asociación debe llevarse a cabo en sujetos con distintas características fisiológicas, ya que las respuestas serán distintas, por lo tanto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar la relación entre la dieta, la microbiota intestinal, marcadores de estrés oxidativo y parámetros inmunológicos, en adultos de mediana edad, sujetos de edad avanzada, pacientes de alergia como modelo de hipersensibilidad y lupus eritematoso sistémico (LES) como modelo de autoinmunidad.

La recogida de la información dietética, necesaria para la evaluación nutricional, se llevó a cabo mediante una entrevista individual y utilizando, para ello, un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA) de tipo semicuantitativo, especialmente diseñado para este estudio. En el momento de la entrevista también se registró la talla y peso de los participantes para el posterior cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) de Quetelet, y se recogió información relativa al estilo de vida del sujeto, como es el hábito tabáquico o la práctica de ejercicio físico. A partir de la información relativa al consumo de alimentos, se procedió al cálculo de la ingesta de energía, macro y micronutrientes, así como otros componentes de interés, como son los distintos tipos de fibras y polifenoles. Cada uno de los participantes donó una muestra de sangre en la que, además de la bioquímica general, se determinaron las concentraciones séricas del marcador de lipoperoxidación malondialdehído (MDA) y la capacidad antioxidante total (CAT). Asimismo, el Grupo de Inmunología de la Universidad de Oviedo llevó a cabo la cuantificación de los parámetros inmunológicos. Se recogió una muestra de heces de cada sujeto que fue analizada por el Grupo de Probióticos, Prebióticos y Exopolisacáridos del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (PLA-CSIC), en la que se determinaron las poblaciones bacterianas presentes, así como la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Los resultados permitieron identificar a alimentos de consumo habitual, como el pan, la naranja y manzana, hortalizas como la patata y bebidas como el vino tinto y el café, como posibles moduladores tanto de la composición microbiana como de su actividad metabólica, efecto que podría venir mediado por su contenido en fibra y/o polifenoles. La importancia de la microbiota intestinal, como sugieren los estudios previos, radica, entre otras razones, en su capacidad para influir sobre las respuestas inmunes del hospedador, pero también podría ser responsable de parte de la actividad antioxidante de los polifenoles de la dieta. En este sentido, los menores niveles de MDA encontrados en sujetos consumidores habituales de vino tinto, junto con una composición microbiana distinta a la de los no consumidores, podrían corroborar estas evidencias científicas. De



esta manera, la dieta podría influir sobre el sistema inmune de manera indirecta, a través de la modulación de las poblaciones bacterianas, pero también de manera directa, como lo sugieren las asociaciones encontradas entre la ingesta de AGM, AGP y vitamina C y algunos parámetros inmunológicos.

Por lo tanto, aunque los estudios epidemiológicos no permiten establecer causalidad, nuestros resultados podrían aportar algo de luz en el estudio de esta compleja relación, así como ser de utilidad, en un futuro, a la hora de diseñar estrategias dietéticas específicas que permitan mejorar la calidad de vida de estos colectivos estudiados.

RESUMEN (en Inglés)

In the last decades, scientific evidence has demonstrated the close relation between diet and the immune system. Thus, while the role of some vitamins, minerals and polyunsaturated fatty acids (PUFA) has been extensively studied, other components, such as monounsaturated fatty acids (MUFA) or polyphenols have received less attention. The most novel developments in this field of study have suggested that intestinal microbiota could be a key part of this association between diet and immune system, leading to the emergence of dietary strategies aimed to improve health through the modulation of bacterial populations. According to this, the study of pro and prebiotics has received much attention in recent years, however, there are few studies evaluating the effect of regular diet on this ecosystem. Therefore, we hypothesize that regular diet impacts on health through diverse ways, including its influence on the immune system and oxidative stress and the modulation of the intestinal microbiota composition. It has been suggested that the study of this association should be conducted in subjects with different physiological characteristics, since the responses could be different. Therefore, the main objective of this Thesis is to evaluate the relation between diet, intestinal microbiota, markers of oxidative stress and immunological parameters in middle-aged and elderly subjects, allergy patients as a model of hypersensitivity and systemic lupus erythematosus (SLE) patients as a model of autoimmunity.

Dietary intake of the participants was registered in an individual interview and using a semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ), specially designed for this study. During the interview it was measured the height and weight of the participants for the subsequent calculation of Quetelet Body Mass Index (BMI), and information about lifestyle of the subject, such as smoking habit or physical exercise, was also collected. From the information about food consumption, we proceeded to calculate the intake of energy, macro and micronutrients, as well as other components, such as the different types of fibre and polyphenols. Each subject donated a blood sample for the determination of general biochemical markers, serum concentration of the lipoperoxidation product malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) and immunological parameters, the latter being performed by the Immunology Group of the University of Oviedo. Additionally, it was collect a stool sample that was analysed by the Group of Probiotics, Prebiotics and Exopolysaccharides of the Institute of Dairy Products of Asturias (PLA- CSIC), for the quantification of bacterial populations and short-chain fatty acid (SCFA) concentrations.

Results allowed us to identify commonly consumed foods, such as bread, orange and apple, potatoes, red wine and coffee, as potential modulators of both microbial composition and its metabolic activity, effect that could be mediated by its content in fibre and/or polyphenols. Previous studies have suggested that the importance of the intestinal microbiota, among other things, lies on its ability to influence the immune responses of the host, but it could also be partly responsible for the antioxidant activity of dietary polyphenols. Thus, lower levels of MDA were found in regular consumers of red wine, together with a different microbial composition, in comparison with non-consumers of this beverage, results that could corroborate this scientific evidence. Thus, the diet might influence the immune system indirectly, through the modulation of the bacterial population, but also directly, as is suggested by the association found between the intake of MUFA, PUFA and vitamin C and some immunological parameters.

Therefore, although epidemiological studies do not establish causality, our results could shed some light on the study of this complex relation, as well as being useful in the future for the design of specific dietary strategies aimed to improve the quality of life of these subject groups.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que, por su esfuerzo, su ayuda o sus palabras de ánimo, han contribuido a que haya sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi directora, la Dra. González Solares, el haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo y, lo que para mí es aún más importante, el haber guiado mi camino, a lo largo de estos cuatro años, desde el respeto y la confianza. Le doy las gracias, también, por su inagotable paciencia y su enorme generosidad y entusiasmo a la hora de transmitirme sus conocimientos.

A las Dras. Lasheras y M. Patterson, les agradezco el haberme ofrecido su sabio consejo siempre que lo he necesitado.

También me gustaría dar las gracias, muy especialmente, a los compañeros del Grupo de Inmunología y del Grupo de Probióticos, Prebióticos y Exopolisacáridos del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), ya que este trabajo es fruto también de su esfuerzo.

A todos los compañeros del Área de Fisiología, en especial a María, cuya alegría y sentido del humor han hecho mucho más amenas las largas horas de trabajo, y a Paula, siempre dispuesta a animarme cuando el ánimo flaqueaba.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por tirar de mí en los malos momentos y porque los valores que me han inculcado son los que me han hecho llegar hasta aquí.

Mis amigas, otro de mis pilares, les doy las gracias por su valiosa compañía y por “estar ahí” siempre.

Por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias a todos los voluntarios que han participado en este estudio, ya que sin su generosa aportación, esto no habría sido posible.

A todos ellos, muchas gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

AACC	<i>American Association of Cereal Chemist</i> (Asociación Americana de Químicos de los Cereales)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ARN	Ácido ribonucleico
CAT	Capacidad antioxidante total
CESNID	Centro de Enseñanza Superior de Nutrición y Dietética
CFCA	Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
FOS	Fructo-oligosacáridos
GOS	Galacto-oligosacáridos
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteínas de alta densidad)
IDR	Ingesta dietética de referencia
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baja densidad)
LES	Lupus eritematoso sistémico
MDA	Malondialdehído
NF-$\kappa$$\beta$	<i>Nuclear factor kappa beta</i> (factor nuclear kappa beta)

NK	<i>Natural killer</i> (naturales asesinas)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i> (Unidades operacionales taxonómicas)
PCR	Proteína C reactiva
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i> (Índice de actividad de lupus eritematoso sistémico)
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i> (factor de crecimiento transformante beta)
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura de Estados Unidos)

INTRODUCCIÓN	13
LA NUTRICIÓN COMO CIENCIA	13
NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL	16
INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	16
IMPACTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE LA SALUD	20
INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL	23
Componentes dietéticos relacionados con la microbiota intestinal	25
1. Fibra dietética y sus fuentes alimentarias	25
1.1. Evidencias científicas del efecto de la fibra sobre la salud	27
1.1.1. Efecto prebiótico de la fibra dietética	28
1.1.2. Fermentación de la fibra y producción de ácidos grasos de cadena corta	31
2. Polifenoles y sus fuentes alimentarias	36
2.1. Evidencias científicas del efecto de los polifenoles sobre la salud	38
2.2. Evidencias científicas del efecto de los polifenoles sobre la microbiota intestinal	39
DIFERENCIAS EN LA RELACIÓN ENTRE LA DIETA, LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL SISTEMA INMUNE EN DISTINTOS GRUPOS DE POBLACIÓN	42
ENVEJECIMIENTO	42
SUJETOS CON PATOLOGÍAS DEL SISTEMA INMUNE	46
1. Alergia como modelo de hipersensibilidad	46

2. Lupus eritematoso sistémico como modelo de autoinmunidad	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
SUJETOS Y MÉTODOS	57
RECLUTAMIENTO DE LA MUESTRA	57
ADULTOS DE MEDIANA EDAD Y SUJETOS DE EDAD AVANZADA	57
SUJETOS CON PATOLOGÍAS DEL SISTEMA INMUNE	58
1. Pacientes de alergia y sujetos control	58
2. Pacientes de lupus eritematoso sistémico y sujetos control	59
METODOLOGÍA	60
EVALUACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA	61
1. Recogida de la información dietética	61
2. Cuantificación de las porciones consumidas	61
3. Cálculo de la ingesta de nutrientes y otros componentes dietéticos	62
4. Valoración del grado de adecuación a las Ingestas Dietéticas de Referencia	63
VALORACIÓN ANTROPOMÉTRICA	63
ANÁLISIS BIOQUÍMICO	64
1. Marcadores de estrés oxidativo	64
2. Parámetros inmunológicos	65
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	66
1. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	66
2. Secuenciación del ARN ribosomal 16S	67
CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA	69
PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	70

RESULTADOS	75
OBJETIVO 1	75
PUBLICACIÓN 1: <i>Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly -</i>	77
TABLAS Y GRÁFICOS ADICIONALES	85
1. Adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada	85
2. Pacientes de alergia y sujetos control	89
3. Pacientes de lupus eritematoso sistémico y sujetos control	94
OBJETIVO 2	99
PUBLICACIÓN 2: <i>Microbiota modulation by diet in humans. Prebiotics, fibres and other compounds</i>	101
OBJETIVO 2 (a)	105
MANUSCRITO 1: <i>A pilot study of diet and microbiota: interactive associations between fibers and polyphenols with human fecal bacteria</i>	109
MANUSCRITO 2: <i>Polyphenols from red wine and coffee are associated with specific intestinal microorganisms in allergic subjects</i>	133
MANUSCRITO 3: <i>Polyphenols from oranges and apples are associated with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients</i>	151
OBJETIVO 2 (b)	173
PUBLICACIÓN 3: <i>Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly</i>	175
OBJETIVO 3	181
PUBLICACIÓN 4: <i>Red wine consumption is associated with fecal microbiota and malondialdehyde in a human population</i>	183
PUBLICACIÓN 5: <i>Fatty acids intake and immune parameters in the elderly</i>	203
TABLAS ADICIONALES	209

DISCUSIÓN	215
CONCLUSIONES	245
ANEXOS	251
BIBLIOGRAFÍA	255
INFORME SOBRE LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	279

INTRODUCCIÓN

LA NUTRICIÓN COMO CIENCIA

La Nutrición Humana se puede definir como “la ciencia de las interrelaciones entre el hombre y el alimento”. El motivo de anteponer esta definición a otras con, quizás, mayor afán académico, radica en su validez para cualquier sociedad y momento histórico.

En la ciencia de la Nutrición se precisa integrar los datos adquiridos mediante diversas fuentes de investigación fundamental y aplicada, inter y multidisciplinaria, por ello, su avance tuvo que esperar al desarrollo de otras ciencias como la Química, la Biología, la Genética y la Epidemiología, entre otras, que han hecho posible el estudio de sus bases científicas. Sin embargo, ya Hipócrates (460-370 a.C.), en la Antigua Grecia, señaló la acción de los alimentos para el mantenimiento de un buen estado de salud, con la frase “deja que tu alimento sea tu medicina y que tu medicina sea tu alimento”. De este periodo histórico proviene la palabra dieta (del griego *daita*, régimen de vida), término que no se refería exclusivamente a la alimentación, sino al estilo de vida en su conjunto.

El inicio de la Nutrición como ciencia tuvo lugar tras las observaciones del químico francés Lavoisier (1743-1794), quién calificó a los alimentos como combustibles, cuya oxidación suministra de energía al organismo ⁽¹⁾. Los posteriores avances científicos en esta línea culminaron con el denominado "concepto energético de la nutrición", que enuncia que los principales componentes de los alimentos, hidratos de carbono, lípidos y proteínas, son fuente de energía oxidativa, de manera que los cambios de energía que tienen lugar en el organismo obedecen los principios generales

de la termodinámica. Años más tarde, Von Liebig (1803-1873) introdujo el papel estructural de las proteínas, sugiriendo que los alimentos también serían portadores de otros compuestos con funciones adicionales para el organismo ⁽²⁾. Experimentos llevados a cabo, a principios del siglo XX, por el científico holandés Pekelharing, demostraron que dietas a base de una mezcla de hidratos de carbono, grasas y sales inorgánicas no eran suficientes para permitir la supervivencia de los ratones sometidos al ensayo. Sin embargo, estos sí lograban sobrevivir cuando a la dieta se le añadían pequeñas cantidades de leche ⁽³⁾. Este hallazgo pasó desapercibido hasta que Hopkins, en 1912, puso de manifiesto la existencia de unas sustancias orgánicas en la leche, a las que denominó “factores accesorios de la alimentación”, sentando la base del estudio de las vitaminas ⁽⁴⁾.

El término vitamina, descrito por el bioquímico polaco Funk en el año 1911 ⁽⁵⁾, deriva de la palabra “amina”, por poseer un grupo amino en su composición química, y “vital”, porque, en muy pequeñas cantidades, son necesarias para mantener vivo el organismo. El descubrimiento de estos nutrientes permitió asociar su ausencia en la dieta con la aparición de enfermedades muy frecuentes a lo largo de la historia, tales como escorbuto, raquitismo, beriberi, etc. Nace, así, el concepto de enfermedad carencial y empieza a comprenderse la íntima relación entre el estado nutricional y la salud, de manera que gran parte de los avances científicos posteriores, en este campo, fueron encaminados a determinar las cantidades de nutrientes necesarias para la prevención de estas patologías.

A partir de la segunda mitad del siglo XX, los países desarrollados fueron testigos de un profundo cambio en su estructura social y económica. Gracias a la mejora de las condiciones de salubridad, los avances médicos y el acceso a una dieta variada y abundante, la mayoría de las enfermedades carenciales pasaron a formar parte de nuestra historia reciente. Sin embargo, este cambio en los hábitos de vida ha conducido a un paulatino incremento en la incidencia de enfermedades crónicas que, sumado al, cada vez más, envejecimiento poblacional, está generando una nueva problemática social que requiere medidas de actuación.

Como se puede apreciar en el Gráfico 1, los principales problemas de salud crónicos a los que, hoy día, se enfrenta la población de nuestro país, no sólo son enfermedades con un alto índice de mortalidad asociada, como el cáncer o la enfermedad cardíaca y cerebrovascular, dolencias muy asociadas al envejecimiento, sino también ciertas patologías que, aun no siendo especialmente graves, sí revisten de un fuerte impacto sobre la calidad de vida de las personas, como ocurre con la alergia, la diabetes o el asma.

Conscientes de que la alimentación es uno de los principales factores modificables que influyen sobre el desarrollo de enfermedades crónicas ⁽⁶⁾, la ciencia de la nutrición ha sufrido un cambio de rumbo, de manera que los esfuerzos en este campo han pasado de estar orientados a cubrir las necesidades nutricionales de la población, a utilizar la alimentación como vehículo para la optimización del estado de salud y la calidad de vida de las personas, a través de la mejora de su estado inmune o la prevención del daño por estrés oxidativo, entre otras vías.

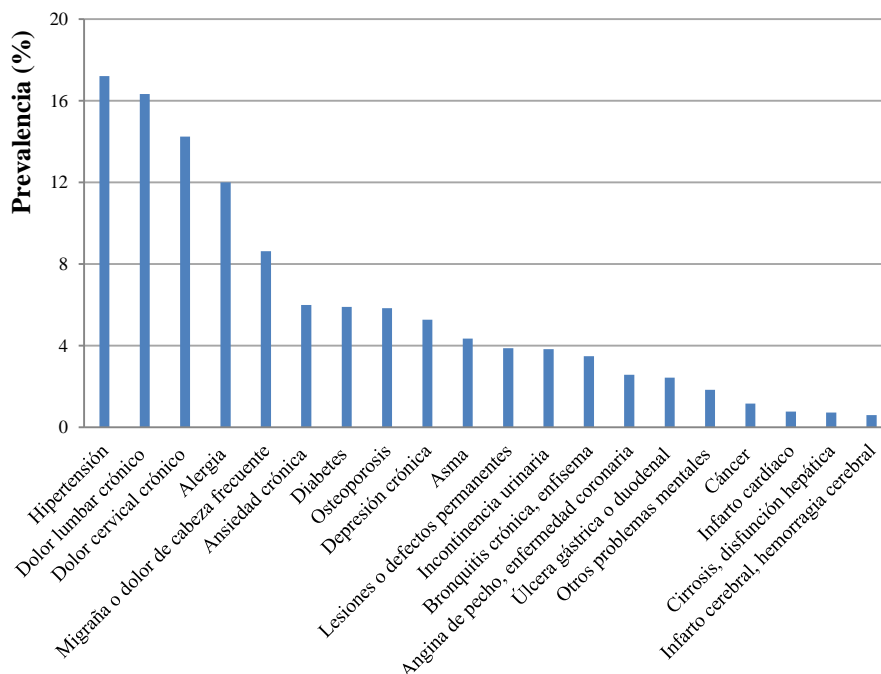


Grafico 1. Prevalencia de enfermedades o problemas de salud crónicos diagnosticados por un médico y padecidos en los últimos 12 meses, en población mayor de 16 años. Encuesta Europea de Salud en España 2009. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad.

NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL

INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Los grandes periodos de hambruna que ha sufrido el ser humano a lo largo de su historia siempre han ido acompañados de epidemias y alto índice de mortalidad, poniendo de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre la nutrición y el sistema inmune. Scrimshaw, en el año 1959, postuló que “muchas de las infecciones importantes que afectan a la población humana son más graves en sus consecuencias en presencia de malnutrición y,

en muchos casos, la infección por sí misma puede dar lugar a trastornos nutricionales”⁽⁷⁾.

La malnutrición energético-proteica es, hoy día, una de las principales causas de inmunodeficiencia en la población⁽⁸⁾. Una ingesta inadecuada de proteínas puede dar lugar a un descenso en los niveles sanguíneos de aminoácidos, comprometiendo el funcionamiento del sistema inmune, tanto en países en vías de desarrollo, en los que son frecuentes las carencias nutricionales, como en colectivos vulnerables de las sociedades desarrolladas, como los ancianos o los pacientes hospitalizados⁽⁹⁾. Una ingesta inadecuada de macronutrientes suele ir acompañada de carencias en micronutrientes, cuya importancia para el correcto funcionamiento del sistema inmune ha sido ampliamente descrita. Uno de ellos es la vitamina A, cuya deficiencia se asocia con alteraciones en la integridad de las mucosas, favoreciendo la translocación de patógenos, con una menor actividad de macrófagos y células *natural killer* (NK)⁽¹⁰⁾ y con una mayor producción de interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)⁽¹¹⁾. Las vitaminas C y E, dos de los antioxidantes más abundantes de la dieta, son indispensables para prevenir el daño generado por los radicales libres durante la fagocitosis, de manera que bajas concentraciones de estos nutrientes se han asociado con fallos en la respuesta inmune^(12;13), mientras que la suplementación dietética con dosis elevadas de vitamina C reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias⁽¹⁴⁾ y mejora la respuesta inmune de los sujetos a través de un incremento en la actividad de las células NK⁽¹⁵⁾. En cuanto a los minerales, el selenio es imprescindible para la correcta actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa⁽¹⁶⁾. Deficiencias en selenio se

han asociado con la disminución del título de inmunoglobulinas ⁽¹⁷⁾, mientras que la suplementación con zinc ha dado lugar a mejoras en la actividad de las células NK y en la respuesta de anticuerpos, así como a un incremento en el número de células T citotóxicas ⁽¹⁸⁾.

Los alimentos de origen vegetal, como las frutas y verduras, son la principal fuente de antioxidantes de la dieta, y, como tal, su consumo ha sido relacionado con un efecto protector frente al daño por radicales libres e inflamación. En este sentido, algunos resultados asocian un consumo adecuado de estos alimentos con menores niveles plasmáticos de marcadores de lipoperoxidación y mayores de compuestos antioxidantes ⁽¹⁹⁻²¹⁾. Otros autores han publicado el efecto de algunas variedades concretas de fruta sobre el sistema inmune, al observar un descenso en los niveles de proteína C-reactiva (PCR) tras la suplementación con pomelo ⁽²²⁾, o de marcadores de oxidación proteica en dietas suplementadas con arándanos ⁽²³⁾. El vino tinto, componente esencial de la dieta mediterránea, ha atraído mucha atención en los últimos años por su efecto beneficioso sobre la salud cardiovascular a través de diversas vías ⁽²⁴⁾.

Además del contenido de estos alimentos en vitaminas y minerales, son ricos en otros compuestos con actividad antioxidante, como son los polifenoles, cuyo consumo ha sido asociado con la prevención de la enfermedad cardiovascular ^(25;26), cáncer o enfermedades neurodegenerativas ⁽²⁷⁾. Aunque son necesarios más estudios que permitan esclarecer las vías de actuación de estos componentes dietéticos, entre los mecanismos que se han propuesto se encuentra su capacidad para prevenir la oxidación de las

lipoproteínas de baja densidad (LDL), inhibir la producción de mediadores pro-inflamatorios ⁽²⁸⁾, su participación en el mantenimiento del endotelio vascular ⁽²⁹⁾ y la inhibición de la agregación plaquetaria ⁽³⁰⁾.

Hasta la fecha, muchos de los trabajos publicados en el campo de la inmunonutrición se han centrado en evaluar los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) de la dieta sobre el sistema inmune. En este contexto, mientras a los de la familia omega 6, tradicionalmente, se les han atribuido propiedades pro-inflamatorias ⁽³¹⁾, los de la familia omega 3 se han asociado con un efecto protector frente a diversas enfermedades crónicas de base inflamatoria ⁽³²⁾. Sin embargo, su efecto inmunosupresor, a través de la disminución de la proliferación y actividad de linfocitos T y células NK ⁽³³⁾, lleva a plantear que un consumo elevado de estos ácidos grasos podría favorecer la susceptibilidad a la infección, especialmente en sujetos vulnerables. Resultados procedentes de un estudio epidemiológico llevado a cabo en esquimales, a principios de los años 70, apoyan estas evidencias científicas, ya que sus autores encontraron que esta población, caracterizada por una dieta rica en pescado graso, presentaba una baja prevalencia de enfermedades inflamatorias pero sí elevada de tuberculosis ⁽³⁴⁾. El papel de los ácidos grasos monoinsaturados (AGM), por el contrario, ha recibido menos atención, a menudo considerados “neutros” sobre el sistema inmune, y, frecuentemente, utilizados como placebo en estudios de intervención en este campo ⁽³⁵⁾. Sin embargo, trabajos recientes llevados a cabo con modelos animales señalan que la suplementación dietética con aceite de oliva, como fuente de AGM, se asocia con una menor proliferación de linfocitos T y actividad de las células NK ^(36;37). En un estudio de intervención con humanos

se encontró una menor expresión de moléculas de adhesión celular tras la intervención dietética con aceite de oliva, mientras que la proliferación linfocitaria y la actividad citotóxica de células NK no se vieron afectadas ⁽³⁸⁾. Dados estos resultados, los próximos estudios en esta línea deberían tener en cuenta el papel de los AGM sobre el sistema inmune, ya que estos componentes de la dieta podrían ser beneficiosos en la prevención del daño por inflamación, sin ir acompañados de una inmunosupresión tan marcada como ocurre con los ácidos grasos omega 3.

A lo largo de las últimas décadas, se ha ido haciendo cada vez más evidente la estrecha relación entre el sistema inmune y la microbiota intestinal, poniéndose de manifiesto que estos microorganismos, más allá de ser meros residentes pasivos, podrían ejercer una profunda influencia sobre la salud. Aunque las vías de actuación no están del todo claras, los avances científicos apuntan a que este ecosistema desempeña un papel muy importante, tanto en el desarrollo del sistema inmune en la infancia, como en la modulación de las respuestas inmunológicas a lo largo de toda la vida adulta ^(39;40), resaltando la necesidad de generar conocimiento acerca de su composición, funcionamiento e impacto sobre la salud del hospedador.

IMPACTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE LA SALUD

Las primeras evidencias científicas del posible papel beneficioso de algunas bacterias intestinales datan ya de principios del siglo XX, como resultado de las observaciones llevadas a cabo por el científico ruso Metchnikoff (1845-1916), quien propuso que era posible modular las poblaciones intestinales de algunos microorganismos patógenos mediante la

inclusión de otros con actividad beneficiosa ⁽⁴¹⁾, sentando, de esta manera, las bases para el posterior estudio de lo que hoy conocemos como probióticos. Sin embargo, el término probiótico (del latín *pro*, a favor de, y del griego *bio*, vida) fue utilizado por primera vez en el año 1965 por Lilly y Stillwell, haciendo referencia a “sustancias secretadas por un microorganismo que favorecen el crecimiento de otros microorganismos” ⁽⁴²⁾. Parker, en el año 1974, introdujo una definición similar a la que conocemos hoy día, como “organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal” ⁽⁴³⁾. En la actualidad, una de las definiciones más aceptadas es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2002, que dice que los probióticos son "microorganismos vivos que, suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios para la salud del hospedador" ⁽⁴⁴⁾.

Los principales grupos microbianos catalogados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, asociados, tanto en ensayos *in vitro* como en modelos animales, con un efecto positivo en la prevención y/o mejora de los síntomas de algunas patologías, como intolerancias alimentarias, diarreas, estreñimiento, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer o alergias, entre otras ⁽⁴⁵⁾. La industria alimentaria se ha hecho eco de ello, surgiendo, así, una extensa gama de productos dirigidos a mejorar la salud de los consumidores a través de su impacto sobre la microbiota intestinal. Sin embargo, aunque algunos estudios llevados a cabo en humanos han probado que la suplementación con probióticos mejora la sintomatología de algunas patologías intestinales ^(46;47), los resultados procedentes de trabajos en población sin un diagnóstico patológico previo son poco concluyentes ^(48;49).

Se ha sugerido, recientemente, que la eficacia de los probióticos podría estar condicionada por factores como son el estado inmunológico del sujeto o la composición de su microbiota intestinal, de forma que el diseño de probióticos, en un futuro, debería tener en cuenta el colectivo al que va dirigido, ya que sus características fisiológicas serán distintas.

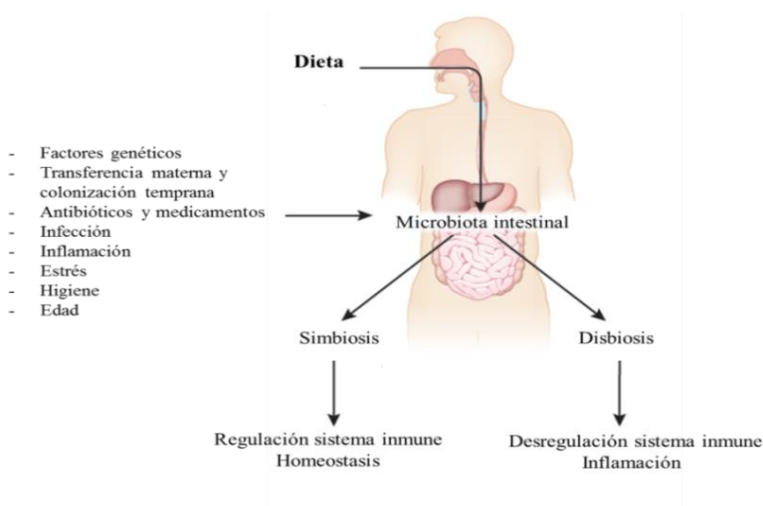


Figura 1. Dieta, composición de la microbiota intestinal y sistema inmune. Extraído de Malowski, K.M. & Mackay, C.R. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol.* 2011;12(1)5:9.

En este contexto toma especial importancia la dieta, partiendo de la base de que ésta no sólo tiene capacidad para actuar sobre el sistema inmune de manera directa, sino también de manera indirecta, a través de la modulación de la microbiota intestinal, cuya composición y metabolitos podrían influir sobre las respuestas inmunes más allá del tracto gastrointestinal⁽⁵⁰⁾ (Figura 1).

Aunque el estudio de la microbiota intestinal presenta numerosos obstáculos, dada su enorme complejidad o su difícil acceso, las novedosas

técnicas analíticas están permitiendo profundizar, por primera vez, en el conocimiento de su composición, y definir, así, una microbiota intestinal dominante en humanos. Se ha sugerido que este ecosistema podría estar compuesto, en su mayoría, por grupos bacterianos pertenecientes a los Filos Firmicutes, representado principalmente por miembros del *cluster Clostridium XIVa* (grupo *Blautia coccooides*), y Bacteroidetes. Se estima que ambos suman en torno al 90% de los grupos filogenéticos existentes en este ecosistema ⁽⁵¹⁾. El Filo Actinobacteria, mayoritariamente miembros del género *Bifidobacterium*, y Verrucomicrobia, representada principalmente por el género *Akkermansia*, así como otros grupos, como *Lactobacillus*, son también miembros importantes de la microbiota intestinal humana ⁽⁵²⁾. Si bien estos grupos bacterianos están presentes en la microbiota intestinal de todos los sujetos, la proporción en la que lo hace es variable en función de diversos factores ⁽⁵²⁾, razón que podría explicar el escaso éxito de las intervenciones con probióticos.

INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Diversos trabajos han puesto de manifiesto que la dieta es uno de los principales factores ambientales que determinan la composición de la microbiota intestinal. Esta estrecha relación es resultado de un proceso co-evolutivo a lo largo de casi medio billón de años, por el que las dietas ricas en polisacáridos de nuestros antepasados han forzado la evolución hacia una microbiota dominada por bacterias sacarolíticas, fundamentalmente del Filo Firmicutes, capaces de extraer energía adicional de los alimentos, además de ofrecer otros beneficios para la salud del hospedador ⁽⁵³⁾. Sin embargo, los

países industrializados han sufrido un profundo cambio en sus hábitos dietéticos a lo largo de las últimas décadas, resultando en el abandono de un patrón alimentario caracterizado por la abundancia de cereales, tubérculos, legumbres, frutas y verduras, a favor de uno más “occidentalizado”, con un consumo elevado de alimentos refinados, carnes y otros productos de origen animal. Esto, junto con otros factores relacionados con el estilo de vida actual, podría ser uno de los principales responsables del cambio en la composición de la microbiota intestinal ⁽⁵⁴⁾. Diversos trabajos científicos apoyan estas evidencias, como el llevado a cabo por Turnbaugh *et al.* en ratones gnotobióticos trasplantados con microbiota fecal humana, en el que encontraron que la sustitución de una dieta baja en grasa y rica en polisacáridos por una con un alto contenido en grasa y azúcares, daba lugar a un cambio rápido en la composición microbiana, con un incremento en los grupos bacterianos pertenecientes al Filo Firmicutes y un descenso en los pertenecientes a Bacteroidetes ⁽⁵⁴⁾. Otros autores han encontrado resultados en esta misma línea, con un descenso en los niveles de Bacteroidetes y un incremento en Firmicutes y *Prevotella*, tras enriquecer la dieta de los animales en grasa ⁽⁵⁵⁾. Aunque estos resultados indican que la microbiota intestinal es capaz de responder a cambios en la dieta a corto plazo, se ha sugerido que son los hábitos a largo plazo los que definen tanto su composición como actividad metabólica, determinando, por lo tanto, el impacto sobre la salud ⁽⁵⁶⁾. De Filippo *et al.*, compararon la microbiota fecal de dos muestras de sujetos con distintas características nutricionales, encontrando que los sujetos de Burkina-Faso, con una dieta rica en carbohidratos y baja en proteínas animales, presentaban mayores niveles de bacterianas pertenecientes al Filo Bacteroidetes y menos del Filo Firmicutes,

en comparación con sujetos italianos, con una dieta típicamente occidental, rica en grasas y proteínas de origen animal ⁽⁵³⁾.

Las novedosas técnicas de secuenciación, junto con la clasificación de los distintos microorganismos que conforman la microbiota intestinal humana en grupos, denominados enterotipos, basados en la dominancia de ciertos géneros, está permitiendo simplificar el estudio de este complejo ecosistema. En este contexto, en un trabajo reciente publicado por Wu *et al.*, encontraron que los enterotipos estaban fuertemente asociados a los hábitos alimentarios a largo plazo, ya que mientras dietas ricas en proteínas y grasas saturadas se asociaban con un enterotipo *Bacteroides*, las ricas en carbohidratos y vegetarianas se asociaban con un enterotipo *Prevotella* ⁽⁵⁶⁾.

Estas evidencias científicas resaltan la importancia de indagar en las vías mediante las que la dieta modula la microbiota intestinal, así como identificar qué componentes son los responsables de dicho efecto, siendo, hasta la fecha, la fibra dietética uno de los que más atención ha recibido.

Componentes dietéticos relacionados con la microbiota intestinal

1. Fibra dietética y sus fuentes alimentarias

Aunque la fibra es, hoy día, uno de los componentes dietéticos más frecuentemente utilizados en los alimentos funcionales, sus beneficios para la salud ya fueron puestos de manifiesto por Hipócrates, cuando recomendaba consumir el pan con salvado por “sus efectos beneficiosos para los intestinos”.

El término fibra dietética fue acuñado por Hipsley en el año 1953 para definir aquellos componentes de la dieta que no eran digeridos por las enzimas digestivas humanas, y cuyo origen era la pared celular de los vegetales, incluyendo celulosa, hemicelulosa y lignina ⁽⁵⁷⁾. Sin embargo, la relación de la fibra dietética con la salud no fue contemplada en su definición hasta algunos años más tarde, cuando Trowell *et al.* postularon la “hipótesis de la fibra dietética”, en la que se sugería la existencia de una relación inversa entre su consumo y la incidencia de cáncer de colon y enfermedad cardiovascular ⁽⁵⁸⁾.

El concepto de fibra dietética fue evolucionando en paralelo a la mejora de las técnicas analíticas, lo que condujo a la inclusión de un nuevo rango de compuestos, como los oligosacáridos y otros polisacáridos indigeribles, dentro de los cuales podemos destacar el almidón resistente, gomas, mucílagos y pectinas. Como resultado de este avance, se han creado tablas de composición de alimentos que han permitido analizar la ingesta de los distintos tipos de fibra que forman parte de los alimentos, profundizando en el conocimiento científico acerca de la relación fibra-salud.

En la actualidad, una de las definiciones más ampliamente aceptadas es la propuesta por la Asociación Americana de Químicos de los Cereales (AACC) en el año 2001, que describe a la fibra dietética como “la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos, resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Engloba polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas, que promueven efectos fisiológicos

beneficiosos incluyendo el efecto laxante, y/o atenuación de colesterol en la sangre y/o atenuación de la glucosa en sangre”⁽⁵⁹⁾.

1.1. Evidencias científicas del efecto de la fibra sobre la salud

Como se ha comentado previamente, el cambio en los hábitos alimentarios ha conducido a un detrimento en el consumo de alimentos de origen vegetal, que ha repercutido en el consumo de fibra en la población. Datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética llevada a cabo por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), entre los años 2009 y 2010, revelan que el consumo medio de fibra dietética en población adulta española se sitúa entre 17 y 21 g/d⁽⁶⁰⁾, cifras alejadas de los 27- 40 g/d fijados como Objetivo Nutricional por la OMS⁽⁶¹⁾. Estos datos son reseñables dado que, aunque la fibra dietética no es considerada un nutriente *sensu stricto*, existen evidencias sólidas de su implicación en el mantenimiento de la función intestinal y la prevención de trastornos digestivos^(62;63), enfermedad cardiovascular⁽⁶⁴⁾ y algunas formas de cáncer⁽⁶⁵⁾. El efecto de la fibra sobre estas patologías parece dependiente, en gran medida, de sus características físico-químicas, especialmente la solubilidad en agua, determinante, a su vez, de la viscosidad y fermentabilidad de estos compuestos⁽⁶⁶⁾. En este sentido, a la fibra de tipo soluble, que engloba compuestos como las pectinas, almidón resistente, β -glucanos, etc. (Figura 2), tradicionalmente, se le ha atribuido un efecto hipocolesterolemiantes e hipoglucémico, asociándose con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular⁽⁶⁴⁾ y diabetes tipo II⁽⁶⁷⁾. Por otro lado, las fibras insolubles, como la celulosa, la mayoría de las hemicelulosas y la lignina (Figura 2),

ayudan a reducir el tiempo de tránsito intestinal y evitan la sobre-exposición de la mucosa a compuestos tóxicos, limitando, de esta manera, la aparición de algunos trastornos intestinales tales como estreñimiento, diverticulitis o cáncer de colon ⁽⁶⁸⁾.

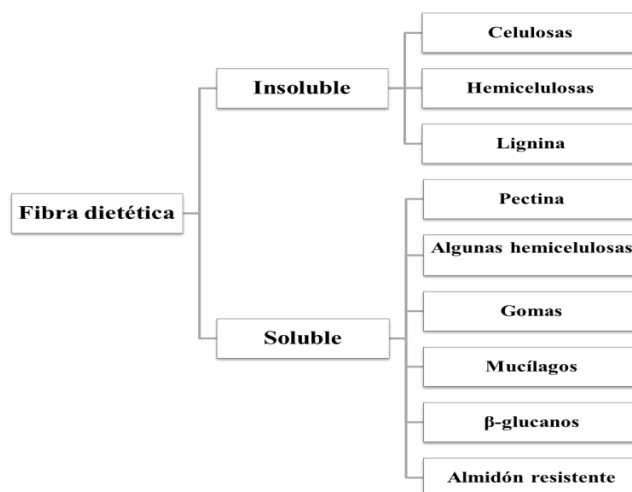


Figura 2. Clasificación de las distintas fibras en función de su solubilidad en agua.

Además de estos efectos ya conocidos, las investigaciones más novedosas en este campo se centran en analizar la implicación de la microbiota intestinal en la relación fibra-salud, ya que se ha sugerido que gran parte de los beneficios que se le atribuyen a este componente de la dieta podrían ser debidos al impacto que ejerce, no sólo sobre la composición de estas poblaciones microbianas, sino también sobre su actividad metabólica.

1.1.1. Efecto prebiótico de la fibra dietética.

El concepto de prebiótico fue introducido por Gibson *et al.*, en el año 1995, como los “ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos

beneficiosos para el hospedador, estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon”⁽⁶⁹⁾. Esta definición fue, posteriormente, ampliada a “ingredientes selectivamente fermentados que permiten cambios específicos, tanto en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, y que confieren beneficios para la salud del hospedador”⁽⁷⁰⁾. Se establecieron, asimismo, los criterios que debe cumplir un compuesto para ser considerado prebiótico, como son la resistencia, tanto a la acidez gástrica y a la hidrólisis por las enzimas digestivas, como a la posterior absorción intestinal; ser sustrato para la fermentación por microorganismos pertenecientes a la microbiota intestinal humana; y estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar, principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*⁽⁷⁰⁾.

La mayoría de los resultados que apoyan el efecto de los prebióticos sobre la microbiota humana proceden de intervenciones dietéticas llevadas a cabo con extractos purificados de estos compuestos. En uno de estos trabajos, se encontraron mayores niveles de algunos grupos bacterianos, como *Faecalibacterium prausnitzii* y algunas cepas de *Bifidobacterium* como *B. adolescentes* y *B. bifidum*, en sujetos sometidos a suplementación con inulina respecto a los sometidos a una dieta control⁽⁷¹⁾, resultados similares a los publicados por otros autores⁽⁷²⁾. Este efecto bifidogénico también ha sido observado tras la intervención dietética con galacto-oligosacáridos (GOS)⁽⁷³⁾. Algunos trabajos ponen de manifiesto la utilidad de los prebióticos en el tratamiento de algunas patologías, como es el caso de la enfermedad de Crohn, cuya sintomatología se vio mejorada tras el tratamiento con fructo-

oligosacáridos (FOS), efecto que sus autores creen que podría estar mediado por el incremento en las poblaciones de *Bifidobacterium* ⁽⁷⁴⁾. Otros encontraron que la suplementación con FOS en ancianos incrementaba los niveles de este grupo bacteriano, junto con un descenso en la concentración plasmática de colesterol y de productos de lipoperoxidación ⁽⁷⁵⁾.

Existen fibras que, aunque no son catalogadas como prebióticas, pueden ejercer impacto sobre la microbiota intestinal, modulando el crecimiento de algunos de sus componentes. Tras analizar el efecto *in vitro* de varios tipos de fibras sobre diversos grupos microbianos intestinales, algunos autores encontraron que la fermentación de β -glucanos se asociaba con un incremento en los niveles de bacterias pertenecientes al Filo Firmicutes, mientras que las pectinas y el almidón resistente se asociaban con un mayor número de *Bifidobacterium* ⁽⁷⁶⁾. Este posible efecto bifidogénico del almidón resistente está en consonancia con un estudio de intervención dietética, en el que dosis elevadas de esta fibra no sólo favorecían el crecimiento de este género probiótico, sino que también se asociaban con cambios sustanciales en grupos microbianos dominantes, con un incremento en los Filos Actinobacteria y Bacteroidetes y un descenso en Firmicutes ⁽⁷⁷⁾.

Hasta la fecha, muchos de los resultados en este campo proceden de trabajos llevados a cabo con fibras aisladas, siendo escasos los que valoran el efecto que ejerce la fibra en conjunto como parte de un alimento ^(78;79). Sin embargo, existen algunos ensayos *in vitro*, como es el caso del trabajo de Connolly *et al.* en el que la fermentación de distintos alimentos elaborados a base de avena con inóculos fecales humanos produjo un incremento en las

poblaciones de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* ⁽⁸⁰⁾. Un trabajo de intervención llevado a cabo en humanos evaluó si el tipo de cereal podría ser un factor que condicionase su impacto sobre la microbiota intestinal, no encontrando diferencias significativas en la composición de la microbiota de los sujetos en función de si consumían cereales enteros o refinados ⁽⁷⁸⁾. Además de los cereales, algunas frutas, como las manzanas, se han asociado con un efecto prebiótico, incrementando los niveles fecales de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* ⁽⁷⁹⁾.

Gran parte de los efectos beneficiosos que se atribuyen a estos grupos bacterianos se deben a su actividad metabólica de tipo sacarolítica, generando compuestos con capacidad para influir sobre el organismo, siendo, hasta la fecha, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) los que revisten de mayor importancia para la salud del hospedador.

1.1.2. Fermentación de la fibra y producción de ácidos grasos de cadena corta

La fibra dietética es fermentada, en mayor o menor grado, por las diferentes poblaciones microbianas que habitan en nuestro tracto gastrointestinal, suponiendo su principal fuente de energía ⁽⁸¹⁾. Los productos resultantes de esta fermentación son, mayoritariamente, ácidos grasos de cadena corta o ácidos grasos volátiles, además de gases (CO₂, CH₄, H₂), calor y otros metabolitos secundarios ⁽⁸¹⁾. La microbiota intestinal también utiliza aminoácidos y proteínas no digeridas como fuente de energía mediante fermentación, dando lugar, principalmente, a ácidos grasos de cadena corta

ramificada, como el isobutirato y el isovalerato, compuestos que, *a priori*, podrían no tener demasiada relevancia para la salud del hospedador.

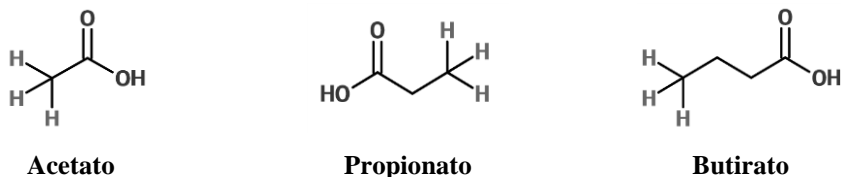


Figura 3. Estructura molecular de los principales ácidos grasos de cadena corta: acetato, propionato y butirato.

En humanos, los principales AGCC sintetizados son acetato, propionato y butirato (Figura 3), en una proporción de 3:1:1, respectivamente ⁽⁸¹⁾. Su síntesis tiene lugar, mayoritariamente, en el ciego y en la parte proximal del colon, y su absorción se realiza, casi en su totalidad, a lo largo de la mucosa ⁽⁸²⁾.

Trabajos científicos de distinta índole han confirmado, recientemente, la importancia de los AGCC en la prevención de algunas patologías, tales como enfermedad cardiovascular, síndrome de colon irritable, enfermedad inflamatoria intestinal o cáncer de colon ⁽⁸³⁾, lo que parece ser resultado de una serie de efectos beneficiosos tanto a nivel local como sistémico. El incremento en la producción total de AGCC se asocia con un descenso en el pH del lumen intestinal, relacionado, a su vez, con la modulación en el crecimiento de algunos grupos bacterianos, el incremento en la solubilidad y absorción de sales biliares y algunos minerales como el calcio, magnesio y hierro, y la reducción en la absorción de algunos compuestos tóxicos, como el amonio ^(81;84).

El acetato es el ácido graso mayoritario, siendo absorbido y transportado, prácticamente en su totalidad, a la circulación sistémica. Interviene en la gluconeogénesis y en la síntesis hepática de colesterol ⁽⁸⁵⁾, estimula la lipogénesis en el tejido adiposo ⁽⁸⁶⁾ y es utilizado como fuente adicional de energía en el tejido muscular ⁽⁸⁵⁾. A nivel del tracto gastrointestinal se ha visto que este ácido graso favorece la motilidad intestinal, incrementa el flujo sanguíneo en el colon y estimula la proliferación de células de la cripta ⁽⁸⁷⁾. También se ha descrito un efecto inmunomodulador, a través de la inhibición de la síntesis de TNF- α y el factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) ⁽⁸⁸⁾ (Figura 4).

El propionato interviene, junto con el acetato, en la gluconeogénesis hepática y en la lipogénesis del tejido adiposo ⁽⁸⁶⁾. Algunos autores han propuesto su participación indirecta en el control de la ingesta, a través del incremento en la síntesis de leptina en el tejido adiposo ⁽⁸⁹⁾. A nivel del tracto gastrointestinal, interviene en el control de la motilidad intestinal ⁽⁸⁶⁾ y la diferenciación de los colonocitos ⁽⁹⁰⁾. Se le ha atribuido, asimismo, un efecto inmunomodulador ^(88;91) (Figura 4).

De todos los AGCC, el butirato es, probablemente, el que ha sido más estudiado en los últimos años. Además de ser la principal fuente de energía de los colonocitos (entre 60-70% de la energía que consumen estas células) ⁽⁹²⁾, este ácido graso también favorece la síntesis de mucina ⁽⁹³⁾, disminuye la permeabilidad celular y contribuye al correcto mantenimiento de las uniones intercelulares ⁽⁹⁴⁾, evitando la translocación de patógenos. Además, su papel en el control de la proliferación de los colonocitos,

mediante la inducción de la apoptosis en células de carcinoma de colon ⁽⁹⁵⁾, sumado a su actividad anti-inflamatoria ⁽⁹⁶⁾ y antioxidante ⁽⁹⁷⁾, han llevado a considerarlo un importante factor en la prevención de cáncer de colon ⁽⁹⁸⁾ (Figura 4).

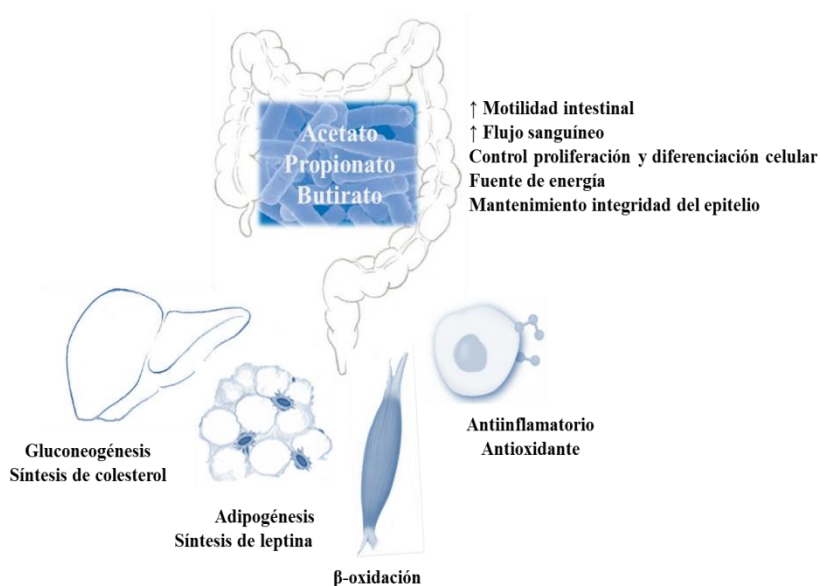


Figura 4. Principales efectos sobre el organismo de los ácidos grasos de cadena corta mayoritarios: acetato, propionato y butirato.

Resultados procedentes de ensayos *in vitro* llevados a cabo mediante la incubación de distintas fibras con inóculos fecales humanos, han puesto de manifiesto que la capacidad de la microbiota intestinal para producir AGCC es altamente variable, siendo el tipo de sustrato uno de los principales factores moduladores. De esta manera, mientras algunas fibras, como las pectinas, son degradadas prácticamente en su totalidad (97%), otras se caracterizan por una escasa fermentabilidad, como ocurre con la celulosa, (7%) ⁽⁹⁹⁾. Sin embargo, además del tipo de fibra, en la síntesis de AGCC en el

colon intervienen otros factores, que, en conjunto, son difícilmente reproducibles en un ensayo *in vitro* ⁽⁸⁵⁾.

Hasta la fecha, son escasos los estudios en humanos que evalúan el impacto de la dieta sobre la producción de estos metabolitos. Segal *et al.*, en el año 1995, encontraron que los niveles fecales de AGCC eran mayores en sudafricanos nativos de raza negra que en sudafricanos de origen caucásico, a pesar de que estos últimos ingerían mayor cantidad de fibra, sugiriendo que la dieta rica en almidón resistente, característica de los nativos, podía ser la causa de las diferencias observadas ⁽¹⁰⁰⁾. El efecto del almidón resistente sobre la producción de AGCC es consistente con los resultados de estudios de intervención en los que la administración de dietas ricas en este componente dietético se asociaban con mayores niveles fecales de butirato ⁽¹⁰¹⁾, acetato y AGCC totales ⁽¹⁰²⁾, planteando que esta fibra podría ser uno de los principales sustratos para la síntesis de AGCC.

Evidencias científicas recientes en este campo apuntan a que muchos de los efectos fisiológicos descritos para un tipo de fibra en concreto se pierden o se modifican cuando ésta es extraída del alimento que la contenía ⁽¹⁰³⁾. Los alimentos contienen mezclas de fibras, en distinta proporción y estructura, hecho que repercute sobre sus características fisicoquímicas y fermentativas ⁽¹⁰³⁾, siendo, por lo tanto, necesario considerar cuál es la procedencia de cada uno de esos compuestos. Algunos autores ya han propuesto hipótesis en esta dirección. Taberero *et al.*, demostraron que las fibras procedentes de cereales generaban una mayor cantidad de propionato respecto al resto de los AGCC, atribuyendo parte de este efecto a los

arabinoxilanos contenidos en estos alimentos ⁽¹⁰³⁾. Otros autores encontraron que dietas ricas en cereales integrales generaba mayores niveles de acetato ⁽¹⁰⁴⁾, ácido graso que también ha sido asociado con el consumo de manzana ⁽⁷⁹⁾. Se ha visto, asimismo, que la fibra procedente de algunas raíces y tubérculos podría ser un buen sustrato para la síntesis de butirato ⁽¹⁰⁵⁾, mientras que la procedente de algunas leguminosas se ha asociado con un efecto propiogénico ^(105;106).

2. Polifenoles y sus fuentes alimentarias

Los alimentos de origen vegetal no sólo son fuente importante de fibra, sino que aportan otros compuestos, como son los polifenoles, metabolitos secundarios que actúan como sistema de defensa de la planta frente a patógenos o radiación, y a los que, hoy día, se les reconoce una importante actividad antioxidante ⁽¹⁰⁷⁾. Sin embargo, esta cualidad pasó desapercibida hasta hace unas décadas, ya que, durante mucho tiempo, la importancia de estos compuestos se limitó a su uso en el curtido de pieles, motivo por el que se conocían con el nombre de “taninos vegetales” (del inglés *tanning*, curtir).

No obstante, el interés industrial por estos compuestos impulsó el desarrollo de técnicas analíticas que permitieron profundizar en el conocimiento de este complejo y diverso grupo de compuestos. De esta manera, aunque en la actualidad no existe una definición propiamente dicha, sabemos que el término polifenol engloba varios miles de compuestos distintos con la característica común de presentar, al menos, un anillo

fenólico en su estructura ⁽¹⁰⁷⁾ y, tradicionalmente, clasificados en: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanos y estilbenos (Figura 5).

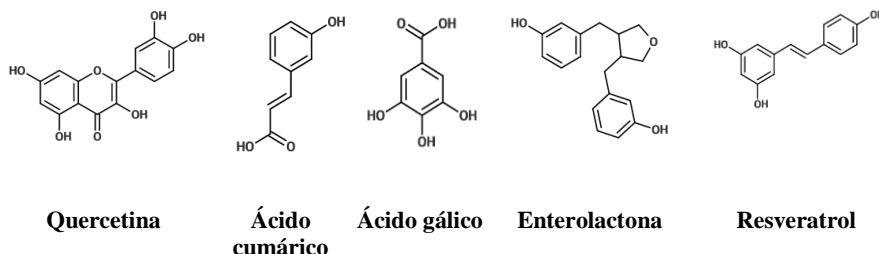


Figura 5. Estructura molecular de la quercetina (flavonoide), ácido cumárico (ácido fenólico), ácido gálico (tanino), enterolactona (lignano) y resveratrol (estilbeno).

Aunque la distribución de los polifenoles es ubicua en los vegetales, la creación de tablas de composición de alimentos con un alto grado de detalle ha permitido identificar al vino tinto, el café, el cacao, los cítricos, las frutas rojas, etc., como las fuentes dietéticas más abundantes de estos compuestos (Tabla 1).

Tabla 1. Fuentes alimentarias más abundantes de cada una de las subclases de polifenoles

Clase	Subclase	Fuentes
Flavonoides	Antocianinas	Saúco y grosella negra
	Flavanoles	Cacao y avellanas.
	Flavanonas	Naranja y pomelo
	Flavonas	Trigo integral, alcachofa y olivas negras.
	Flavonoles	Cebolla roja, espinacas y chalota.
	Isoflavonas	Soja y derivados.
Ácidos fenólicos	Hidroxibenzóicos	Castaña, nuez y frambuesa.
	Hidroxicinámicos	Café, achicoria roja y alcachofa.
Estilbenos		Vino tinto, arándano rojo y grosella roja.
Lignanos		Sésamo y derivados y aceite de linaza.

Extraído de Pérez-Jiménez, J. *et al.* Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem.* 2010, 58, 4959–4969

La presencia habitual de estos alimentos en la dieta española, típicamente mediterránea, eleva el consumo medio de polifenoles, estimado en unos 1.100 mg/d ⁽¹⁰⁸⁾, por encima del de otros países europeos ⁽¹⁰⁹⁾.

2.1. Evidencias científicas del efecto de los polifenoles sobre la salud.

A principios de la década de los 90, el interés por estos compuestos sufrió un crecimiento notable, y no sólo por la comunidad científica, como lo demuestran las numerosas publicaciones en este campo, sino también por el público en general, que ha visto como alimentos de consumo habitual podrían ser protectores frente al desarrollo de patologías crónicas, en cuya base subyace el estrés oxidativo, tales como enfermedad cardiovascular, enfermedades neurodegenerativas o cáncer ^(25-27;107). Sin embargo, el conocimiento acerca de las vías mediante las que los polifenoles ejercen su efecto protector es aún escaso para establecer unas recomendaciones de ingesta.

Las principales dificultades a la hora de abordar el estudio del efecto de los polifenoles sobre la salud se deben al amplio rango de compuestos fenólicos distintos presentes en los alimentos ⁽¹¹⁰⁾, además de su elevada variabilidad tanto en la biodisponibilidad como bioactividad ⁽²⁷⁾, así como la compleja relación que se establece entre estos compuestos y la microbiota intestinal ⁽¹¹¹⁾. Se estima que en torno al 90-95% de los polifenoles que se ingieren con la dieta no son absorbidos en el intestino delgado, sino que llegan al colon donde son sustrato para la degradación microbiana ⁽¹¹²⁾. Como resultado se generan metabolitos que, en muchos casos, presentan una

estructura molecular más simple, lo que les confiere una mayor facilidad para ser captados por la mucosa intestinal, y una actividad biológica incrementada respecto a sus predecesores ⁽¹¹²⁾. Por lo tanto, puesto que algunos grupos bacterianos son responsables del metabolismo de los polifenoles en el colon, el impacto de estos compuestos sobre la salud podría ser variable en función de la composición de la microbiota de cada individuo ^(112;113) (Figura 6).

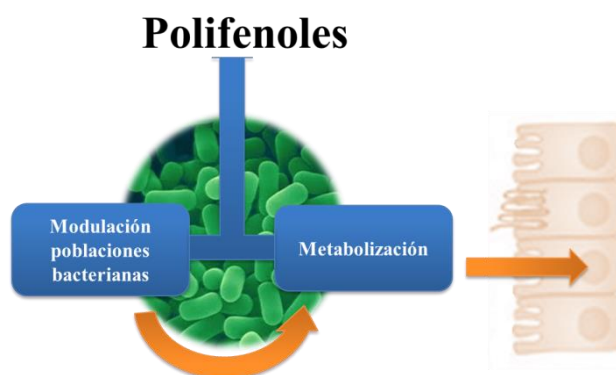


Figura 6. Impacto de los polifenoles sobre la microbiota intestinal.

2.2. Evidencias científicas del efecto de los polifenoles sobre la microbiota intestinal

Evidencias científicas recientes proponen que tanto los polifenoles como sus metabolitos tienen la capacidad para modular las poblaciones bacterianas ⁽¹¹²⁾ (Figura 6). Algunos trabajos en este campo son ensayos *in vitro* que analizan el efecto antibacteriano de altas concentraciones de algunos polifenoles, abriendo una nueva posibilidad para el uso de estos compuestos en la conservación de alimentos ⁽¹¹⁴⁾ y en el tratamiento frente a la infección ⁽¹¹⁵⁾. Uno de ellos es el publicado por Duda-Chodak *et al.*, en el

que encontraron un efecto antibacteriano dosis-dependiente de la naringenina (flavanona) y quercetina (flavonol) sobre algunos grupos, entre ellos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, y *Escherichia coli* ⁽¹¹³⁾. Otros autores, tras incubar 28 grupos bacterianos con polifenoles del té, encontraron que estos compuestos limitaban el crecimiento de algunos patógenos como *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*, mientras que el de otros grupos comensales y probióticos, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se veían menos afectados ⁽¹¹⁶⁾. Este efecto represor de los polifenoles también ha sido observado en animales, como es el caso de un estudio en el que dietas ricas en cacao se asociaban con menores niveles fecales de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Staphylococcus* en ratas ⁽¹¹⁷⁾. Por lo tanto, aunque se requieren más estudios que permitan esclarecer el papel antimicrobiano o prebiótico de los polifenoles, las evidencias apuntan que el efecto de los mismos podría ser dependiente del tipo de compuesto y del grupo bacteriano sobre el que actúan.

Los trabajos en humanos son escasos, pero sí se han llevado a cabo algunas intervenciones dietéticas con extractos de polifenoles o alimentos ricos en estos compuestos. En este sentido, la suplementación con flavanoles procedentes del cacao se ha asociado con mayores niveles fecales de *Blautia coccooides*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, grupos bacterianos habituales en la microbiota dominante humana, mientras que los niveles de *Costridium histolyticum*, grupo dentro del que se encuentra el patógeno *Clostridium perfringens* eran significativamente menores respecto a los registrados al inicio del estudio ⁽¹¹⁸⁾. Otros trabajos mostraron un incremento en los niveles de *Bifidobacterium* tras las suplementación

dietética con té ⁽¹¹⁹⁾ y con arándanos ⁽¹²⁰⁾. El vino tinto es una de las principales fuentes de polifenoles en nuestro país, y como tal, su efecto sobre la microbiota intestinal ha sido evaluado, recientemente, por Queipo-Ortuño *et al.* Estos autores encontraron que la intervención dietética con esta bebida incrementaba los niveles fecales de algunos grupos bacterianos como *Bacteroides*, *Blautia coccoides*, *Enterococcus*, *Prevotella* y *Bifidobacterium*. El incremento de este último grupo bacteriano se asoció, asimismo, con una mejora en las concentraciones plasmáticas de colesterol y proteína C-reactiva ⁽¹²¹⁾.

Puesto que se ha estimado que en torno al 50% de los antioxidantes de la dieta, principalmente polifenoles, atraviesan el tracto gastrointestinal unidos a la fibra dietética, algunos autores proponen que los trabajos en este campo, que se lleven a cabo en un futuro, deberán tener en cuenta la fuente dietética de la que proceden, ya que esto podría condicionar parte de sus efectos fisiológicos ⁽¹²²⁾.

Se ha sugerido, asimismo, que el estudio de la asociación entre la dieta y la microbiota intestinal debería llevarse a cabo en sujetos con distintas características fisiológicas, ya que las respuestas serán distintas ⁽¹²³⁾. Esta premisa nos lleva a plantear este trabajo tanto en personas sanas como en sujetos con alteraciones del sistema inmune: envejecimiento, alergia como modelo de hipersensibilidad y lupus eritematoso sistémico como modelo de autoinmunidad.

**DIFERENCIAS EN LA RELACIÓN ENTRE LA DIETA, LA MICROBIOTA
INTESTINAL Y EL SISTEMA INMUNE EN DISTINTOS GRUPOS DE
POBLACIÓN**

ENVEJECIMIENTO

Según datos recientes del Instituto Nacional de Estadística (INE), la esperanza de vida al nacer en nuestro país se sitúa en 82 años ⁽¹²⁴⁾. A ello se ha unido la disminución de la tasa de natalidad de los últimos años, lo que ha propiciado un progresivo envejecimiento de la población. Se espera que el porcentaje de españoles mayores de 65 años se duplique en los próximos 40 años, lo que supondrá el 32% de la población total ⁽¹²⁵⁾. Por lo tanto, parece necesaria, desde los puntos de vista social y económico, la búsqueda de estrategias que permitan la promoción de la salud y el bienestar durante este periodo de la vida, profundizando en el concepto de envejecimiento activo y apostando por una reorientación de esfuerzos hacia el mantenimiento de la independencia y de la calidad funcional en el mayor grado posible.

Aunque no existe una definición única del envejecimiento, ya que su biología es aún desconocida, según la OMS esta etapa de la vida conlleva el deterioro de las funciones, progresivo y generalizado, conduciendo a una pérdida de la respuesta adaptativa al estrés y un mayor riesgo de padecer enfermedades asociadas. Se distingue entre los conceptos de envejecimiento fisiológico, como un proceso que representa los cambios biológicos universales que se producen con el paso del tiempo, y que no están afectados por la presencia de enfermedades o por el ambiente y, por lo tanto, no tienen por qué conllevar consecuencias clínicas adversas; y envejecimiento

patológico, es decir, cambios en los órganos y sistemas del organismo, acelerados por la presencia de alteraciones patológicas o por influencia de factores ambientales ⁽¹²⁶⁾.

Además de la disminución de la masa magra, cambios metabólicos y de la función cardiovascular, renal y neurológica ⁽¹²⁷⁾, el envejecimiento lleva implícito el deterioro del sistema inmune, proceso conocido como “inmuno-senescencia”, y que implica, tanto la pérdida de la integridad de las barreras físicas como cambios deletéreos a nivel celular ⁽¹²⁸⁾. Aunque no es posible asegurar que el número de células del sistema inmune innato descienda con la edad, lo que sí parece claro es que algunas de sus funciones, como la producción de radicales libres por monocitos/macrófagos y neutrófilos y la capacidad citotóxica de las células NK, podrían verse comprometidas ⁽¹²⁹⁾. La defensa adaptativa también sufre cambios, incluyendo un descenso en el número de células B, una menor diversidad de anticuerpos, así como menor afinidad por el antígeno ⁽¹³⁰⁾, y un cambio en las proporciones de linfocitos T, con mayores niveles de linfocitos T de memoria y menores de linfocitos T citotóxicos, *helper* y *naïve* ⁽¹³¹⁾. Esta desregulación del sistema inmune en edades avanzadas, junto con la continua exposición a antígenos, tiene como consecuencia la sobre-activación o activación crónica de macrófagos y otras células pro-inflamatorias ⁽¹³²⁾. En este sentido, el envejecimiento se asocia con niveles incrementados de algunos mediadores pro-inflamatorios, lo que podría ser responsable de algunas de las patologías características de esta edad, como diabetes tipo II, osteoporosis, aterosclerosis, fragilidad, etc. ⁽¹³³⁾.

Asimismo, durante el envejecimiento son habituales cambios en el tracto gastrointestinal, como la pérdida de piezas bucales, la disminución de la salivación y de las secreciones gástricas, etc., que, junto con el deterioro de la capacidad olfativa y gustativa, afectan, invariablemente, a la manera de alimentarse ⁽¹²⁷⁾. En este contexto, la dieta de las personas mayores suele ser escasa en algunos grupos de alimentos, como frutas y verduras, legumbres, etc., hecho que condiciona, no sólo, la ingesta de macro y micronutrientes, sino también el aporte de otros compuestos importantes como la fibra y los antioxidantes. Como consecuencia, el colectivo de personas mayores es uno de los más heterogéneos y vulnerables de la población, con un riesgo incrementado de sufrir desequilibrios y carencias nutricionales ⁽¹²⁷⁾.

El envejecimiento del sistema inmune y del tracto gastrointestinal, junto con los cambios en la dieta y la mayor incidencia de enfermedades, se consideran entre las principales causas desencadenantes de la alteración de la microbiota intestinal que presenta este colectivo ⁽¹³⁴⁾. Se ha descrito, recientemente, que con el proceso de envejecimiento disminuyen las bacterias pertenecientes al Filo Firmicutes y aumentan los Bacteroidetes, además se reduce la diversidad de especies y la abundancia de algunos grupos beneficiosos como *Bifidobacterium* ⁽¹³⁵⁾, a favor de otros potencialmente patogénicos. Estos cambios en la composición microbiana repercuten en su actividad metabólica, con un descenso en la síntesis de AGCC, y un incremento en la producción de amonio y nitrosaminas, que pueden tener efectos deletéreos para el organismo ⁽¹³⁶⁾. Esta alteración de la microbiota intestinal, además de comprometer la síntesis de algunas vitaminas y la absorción de nutrientes y sales biliares, tiene como

consecuencia un mayor riesgo de inflamación de la mucosa intestinal, lo que favorece, a su vez, el estado inflamatorio sistémico, incrementando el riesgo de enfermedades crónicas en estas edades avanzadas ⁽¹³⁷⁾ (Figura 7).

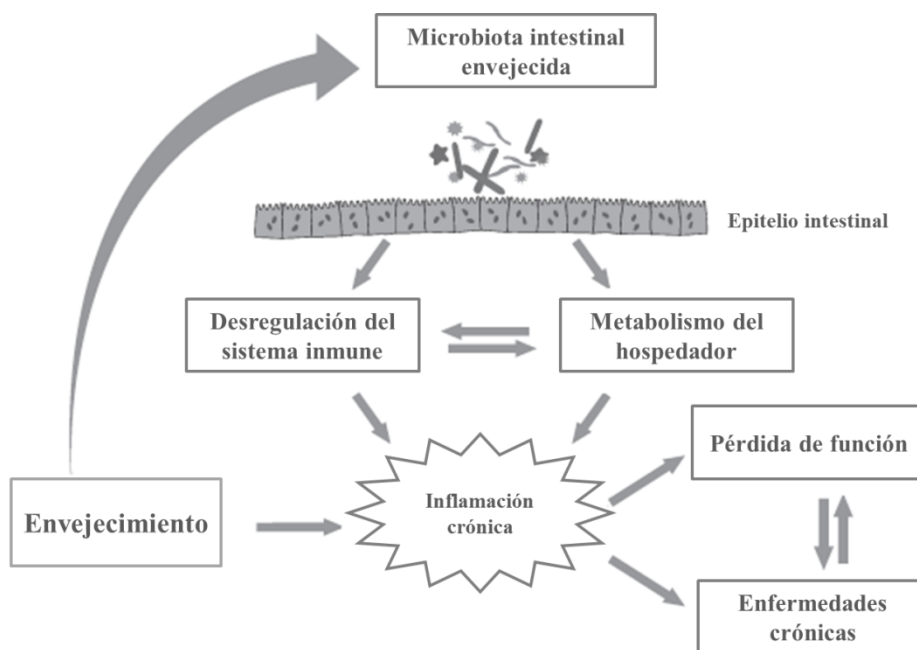


Figura 7. Implicación de la microbiota intestinal en la inflamación crónica y la enfermedad en el envejecimiento. Extraído de Rehman, T. *et al.* Role of the gut microbiota in age-related chronic inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2012, 12, 361-367

Por lo tanto, parece evidente la importancia de la dieta como vehículo para mejorar el estado de salud de las personas de edad avanzada, a través de su impacto sobre la microbiota intestinal. Sin embargo, son escasos los trabajos que evalúan esta asociación en este grupo de población. Se han llevado a cabo algunas intervenciones dietéticas con prebióticos cuyos resultados indican que el tratamiento con cantidades elevadas de estos ingredientes podrían favorecer el crecimiento de grupos bacterianos beneficiosos ^(75;138;139), pero no se ha encontrado en la literatura ningún

estudio que analice el efecto de la dieta habitual sobre la microbiota intestinal en estas edades, lo que podría ser de gran importancia para profundizar en el conocimiento de esta compleja asociación.

PATOLOGÍAS DEL SISTEMA INMUNE

1. Alergia como modelo de hipersensibilidad.

La alergia es un trastorno del sistema inmune caracterizado por una reacción de hipersensibilidad inducida por algunos tipos de antígenos o alérgenos que, en condiciones normales, serían inocuos para el organismo. Aunque la mayoría de estos alérgenos, presentes en los alimentos (proteínas del huevo, leche, frutos secos, etc.) o en el medio ambiente (polen y microorganismos), suelen ser tolerados por el organismo a través de la supresión de las respuestas humorales y celulares, en los procesos alérgicos el sistema inmune responde de manera anormal y exagerada, dando lugar a una serie de manifestaciones clínicas de tipo gastrointestinal, dermatológico y/o respiratorio. En los países desarrollados es una de las enfermedades crónicas más frecuentes, su incidencia (alrededor del 20%) se ha incrementado notablemente en los últimos años ⁽¹⁴⁰⁾, y no sólo en las sociedades occidentales, sino también en los países en vías de desarrollo que están comenzando a adoptar un estilo de vida más industrializado ⁽¹⁴¹⁾.

Aunque en el desarrollo de esta patología influyen diversos factores tanto de tipo genético como ambiental, una de las teorías más aceptadas hasta el momento es la “hipótesis higienista”, propuesta por Strachan en el año 1989, que sugiere que la mejora de las condiciones sanitarias y el incremento

en el uso de antibióticos favorecen la ausencia, durante la infancia, de la estimulación microbiana necesaria para desarrollar la tolerancia inmunológica, dando lugar a respuestas inmunes aberrantes frente a estos antígenos inocuos en edades posteriores ⁽¹⁴²⁾. Esta teoría ha sido revisada, recientemente, sugiriendo que el descenso de infecciones durante la infancia no es tan importante como lo es el tipo de microbiota que coloniza el tracto gastrointestinal en estas edades tempranas ⁽¹⁴³⁾, por lo que el cambio en la composición bacteriana, como resultado del cambio en el estilo de vida en los países occidentales, podría interferir en los mecanismos implicados en el desarrollo de la tolerancia inmunológica ⁽⁴⁰⁾.

Aunque son necesarios más estudios que permitan ahondar en la composición de la microbiota intestinal en este colectivo, algunos autores han encontrado que los niños que desarrollan alergia presentan mayores niveles de bacterias pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Bacteroides* y menos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que sus respectivos controles ⁽¹⁴⁴⁾. En este sentido, el tratamiento inmuno-modulador con algunas de estas cepas probióticas podría ser una buena vía para contrarrestar las respuestas linfocitarias T *helper* 2, exageradas en los procesos alérgicos ⁽¹⁴⁵⁾. El uso de prebióticos también ha sido estudiado, principalmente en niños, en los que se ha encontrado que la inclusión de ingredientes como GOS y FOS en las leches de fórmula podría prevenir el desarrollo de alergia ⁽¹⁴⁶⁾. Sin embargo, no existen antecedentes bibliográficos acerca del impacto de la dieta habitual sobre la microbiota intestinal en estos pacientes, por lo que evaluar esta asociación podría ser relevante a la hora de crear futuras directrices dirigidas

a actuar frente a esta patología y/o a mejorar la calidad de vida de quienes la padecen.

2. Lupus eritematoso sistémico como modelo de autoinmunidad.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica en humanos, caracterizada por la presencia de células inmunes hiperactivas y anticuerpos aberrantes que responden frente a antígenos nucleares y citoplasmáticos propios. Como consecuencia, se genera daño tisular mediado por el sistema del complemento, dando lugar a una serie de manifestaciones clínicas como son: serositis, úlceras orales, artritis, fotosensibilidad, problemas renales y erupción malar ⁽¹⁴⁷⁾.

Aunque la prevalencia de LES varía en función de la población en estudio ⁽¹⁴⁸⁾, ésta se estima en unos 28 casos por cada 100.000 habitantes, cifra que puede alcanzar los 50 casos si se considera sólo población femenina. Los condicionantes que lleva implícitos, tanto físicos (riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, síndrome metabólico y obesidad ⁽¹⁴⁹⁾), como psicológicos, emocionales y socio-económicos, resaltan la importancia de crear dianas de actuación que permitan la mejora de la calidad de vida de estos enfermos crónicos.

Las causas que desencadenan el desarrollo de LES aún no están del todo claras, sin embargo, se sabe que puede estar condicionado por factores genéticos, hormonales y ambientales ^(150;151). Además, evidencias científicas recientes sugieren que la microbiota intestinal de los enfermos de LES es diferente a la de los sujetos sanos ⁽¹⁵²⁾, desequilibrio que podría jugar un papel

importante en la severidad de la enfermedad ⁽¹⁵³⁾. En este punto la dieta es un factor imprescindible a considerar, no sólo debido a la capacidad inmunomoduladora de algunos de sus componentes, sino que también puede ser una vía satisfactoria para la mejora de las comorbilidades asociadas, así como las reacciones adversas consecuencia de su tratamiento farmacológico.

Por lo tanto, aunque son necesarios más estudios que permitan conocer los grupos microbianos afectados, así como su impacto para la salud de estos sujetos, la búsqueda de componentes dietéticos con capacidad para modular estas poblaciones podría ser útil en un futuro como coadyuvante en el tratamiento de la sintomatología asociada a esta enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el contexto de tres proyectos de investigación de carácter multidisciplinar, cuyo objetivo global es generar conocimiento acerca de la composición de la microbiota intestinal en personas de edad avanzada y pacientes de alergia y LES, así como valorar el efecto que ejerce la dieta, para diseñar, en un futuro, nuevos alimentos funcionales dirigidos a mejorar el estado de salud de estos colectivos.

A partir de las evidencias científicas expuestas a lo largo de la introducción, parece plausible la hipótesis de que la dieta desempeña su efecto sobre la salud de los sujetos a través de diversos mecanismos, incluyendo su asociación con la microbiota intestinal, el sistema inmune y el estrés oxidativo. Por tanto, el **objetivo global** de este trabajo es:

Evaluar la relación entre la dieta, la microbiota intestinal, marcadores de estrés oxidativo y parámetros inmunológicos, en cuatro grupos de población distintos desde el punto de vista inmune: personas adultas de mediana edad, personas de edad avanzada, pacientes de hipersensibilidad (alergia) y pacientes de autoinmunidad (LES).

Para llevar a cabo este objetivo global, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Búsqueda de posibles dianas para el futuro diseño de estrategias dietéticas dirigidas a los colectivos en estudio.
 - a) Describir las características generales de cada uno de los grupos evaluados.

- b) Describir la ingesta de alimentos, energía, nutrientes y otros componentes dietéticos, en cada uno de los grupos en estudio, e identificar las diferencias respecto a sus controles.
 - c) Valorar el grado de adecuación a las ingestas recomendadas de nutrientes y a los objetivos nutricionales para población española.
2. Generar conocimiento acerca de la asociación entre la dieta y la microbiota intestinal.
- a) Valorar la existencia de asociaciones entre la ingesta de alimentos, nutrientes y otros constituyentes de la dieta y la composición de la microbiota intestinal.
 - b) Evaluar la relación entre la ingesta de alimentos, nutrientes y otros constituyentes de la dieta y la producción de ácidos grasos de cadena corta.
3. Evaluar el impacto de la dieta sobre marcadores de estrés oxidativo y parámetros inmunológicos.

SUJETOS Y MÉTODOS

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral comienza tras la participación del Grupo de Nutrición de la Universidad de Oviedo en el proyecto titulado “La influencia de una leche prebiótica con *Lactobacillus paracasei* LPC-137 sobre la función inmune de sujetos de edad avanzada”, financiado por la empresa finlandesa Danisco, y llevado a cabo entre los años 2009 y 2010. Su objetivo principal fue evaluar los cambios que tienen lugar durante el envejecimiento en la microbiota intestinal, en el sistema inmune y en el estado nutricional. Posteriormente (2009-2012), se llevó a cabo el reclutamiento de una muestra de adultos de mediana edad, a través del proyecto “Investigación industrial de dietas y alimentos con características específicas para las personas mayores (CENIT-SENIFOOD)”. La concesión en el año 2011 de una ayuda del Plan Nacional de I+D para el proyecto titulado “Caracterización funcional de la microbiota intestinal en algunos trastornos inmunológicos (AGL2010-149520)”, permitió continuar el estudio de la asociación entre la dieta y la microbiota intestinal en pacientes de alergia y lupus eritematoso sistémico, utilizando, para ello, novedosas técnicas de secuenciación.

RECLUTAMIENTO DE LA MUESTRA

ADULTOS DE MEDIANA EDAD Y PERSONAS DE EDAD AVANZADA

Para llevar a cabo el reclutamiento de la muestra de personas de edad avanzada, se contactó con 3 residencias geriátricas, de gestión pública y privada, ubicadas en Gijón (Asturias). Una vez que los directores de cada uno de los centros fueron informados de las características del estudio y de los criterios de inclusión, nos dieron acceso a una lista de posibles participantes.

Los criterios de inclusión para el estudio fueron: ser mayor de 65 años, no haber sido diagnosticado, previamente, de cáncer, enfermedades autoinmunes o patologías intestinales, así como no haber consumido, durante el mes previo, probióticos, prebióticos ni antibióticos.

Los sujetos pre-seleccionados fueron convocados en una reunión en la que se les explicaron los objetivos del estudio y se solicitó su participación. Se reclutaron un total de 43 sujetos, de los que 3 fueron eliminados, *a posteriori*, por carecer de alguno de los parámetros de interés para el estudio. La muestra final se compuso de 40 individuos, 9 hombres y 31 mujeres, con edades comprendidas entre los 76 y los 95 años. Se reclutó, asimismo, una muestra de 38 adultos de mediana edad (11 hombres y 27 mujeres, con edades comprendidas entre los 56 y 67 años), asistentes al Programa Universitario para Mayores de la Universidad de Oviedo.

SUJETOS CON PATOLOGÍAS DEL SISTEMA INMUNE

1. Pacientes de alergia y sujetos control

La selección de los pacientes de alergia, llevado a cabo a través del Servicio de Alergología del Hospital Universitario Central de Asturias, se hizo de acuerdo con los criterios clínicos establecidos por la Encuesta de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea ⁽¹⁵⁴⁾: espirometría y prueba de provocación bronquial con metacolina e inmunoglobulina E total >75 kU/L. Los criterios de inclusión en el estudio fueron: no haber sido diagnosticado de enfermedades autoinmunes, enfermedad inflamatoria intestinal o cualquier otra patología que pudiese afectar a la función intestinal, y no haber sido

sometido a tratamiento farmacológico con antibióticos, corticoides, inmunosupresores, anticuerpos monoclonales ni otro tipo de inmunoterapia durante los 3 meses previos.

Siguiendo estas premisas se seleccionó una muestra inicial de 24 sujetos. Tras la baja en el estudio de uno de los voluntarios, la muestra quedó constituida por 23 sujetos, 10 hombres y 13 mujeres, con edades comprendidas entre los 22 y los 57 años. Se seleccionaron 22 controles de la misma edad y sexo.

2. Pacientes de lupus eritematoso sistémico y sujetos control

La selección de la muestra de pacientes de LES se llevó a cabo a través del Registro de Lúpicos de Asturias. Mediante la revisión de los historiales médicos se recogió información sobre las manifestaciones clínicas que presentaba cada uno de los sujetos, así como los tratamientos farmacológicos a los que estaban sometidos. Todos los participantes en el estudio debían cumplir, al menos, 4 de los criterios establecidos por la Sociedad Americana de Reumatología para LES ⁽¹⁵⁵⁾ y no presentar la enfermedad activa en el momento del reclutamiento (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) puntuación ≤ 7). Asimismo, se excluyeron los pacientes bajo tratamiento farmacológico prolongado, así como aquellos que habían sido sometidos a tratamiento con antibióticos, glucocorticoides, inmunosupresores, anticuerpos monoclonales u otro tipo de inmunoterapia durante los 3 meses previos.

Inicialmente se reclutaron un total de 26 pacientes de LES, todas ellas mujeres, de las cuales se excluyeron 6. La muestra final quedó constituida por 20 pacientes con edades comprendidas entre los 35 y los 70 años. Como grupo control se seleccionaron 20 mujeres, del mismo entorno y edad.

Todos aquellos sujetos, de ambos grupos, que aceptaron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado. Los proyectos en los que se encuadra este trabajo obtuvieron la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias, en conformidad con la Declaración de Helsinki. El proyecto “Caracterización funcional de la microbiota intestinal en algunos trastornos inmunológicos (AGL2010-149520)” obtuvo, asimismo, la aceptación del Comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

METODOLOGÍA

Cada uno de los participantes fue citado telefónicamente para una entrevista individual de, aproximadamente, una hora de duración, en la que se recogió información relativa a la ingesta dietética, junto con información adicional, de interés para el estudio, referente al estilo de vida del sujeto, como es el hábito tabáquico o la práctica de ejercicio físico. En el momento de la entrevista también tuvo lugar la medición antropométrica.

Para completar la información necesaria para el estudio se solicitó, a cada uno de los voluntarios, la donación de una muestra de sangre y una de heces, que fueron recogidas en un intervalo de 7 días.

EVALUACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA

1. Recogida de la información dietética

La información dietética fue recogida mediante un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA) de tipo semicuantitativo, especialmente diseñado para este estudio, compuesto por 160 alimentos distintos organizados por grupos, y de tipo abierto, permitiendo la inclusión de alimentos nuevos en el caso de que el sujeto los consumiese y no estuviesen registrados. Durante la entrevista, el encuestado fue interrogado acerca de la frecuencia con la que consumía cada uno de los alimentos (diaria, semanal o mensual), el tipo y la cantidad, así como información relativa a la preparación de los platos, como el tipo de cocinado, los ingredientes utilizados, etc. Dados los objetivos planteados en el estudio, se hizo especial hincapié en la recogida de información relevante, como, por ejemplo, si consumían la fruta con o sin piel.

2. Cuantificación de las porciones consumidas

Para facilitar el registro de las cantidades de alimento consumidas por el entrevistado se disponía de un álbum de fotos con 3 tamaños de ración estandarizados (pequeño, mediano y grande), de manera que el sujeto podía escoger entre 7 tamaños distintos (desde “menos que la ración pequeña” hasta “más que la ración grande”) (Imagen 1). Para algunos alimentos, las cantidades fueron registradas utilizando medidas caseras de uso habitual, como, por ejemplo, una taza, una cucharada sopera, etc.



Imagen 1. Ejemplo de 3 raciones: pequeña, mediana y grande. Extraído de Gómez., C. *et al.* Guía visual de alimentos y raciones. Editores Médicos s/a (EDIMSA).

Para facilitar el posterior manejo de la información dietética, los alimentos consumidos en la muestra fueron clasificados en grupos, detallados en el Anexo 1.

3. Cálculo de la ingesta de nutrientes y otros componentes dietéticos

La posterior conversión de la ingesta de alimentos en nutrientes se llevó a cabo mediante el diseño de una base de datos (Access, Microsoft Office Professional Plus 2010), en la que se incluyeron las Tablas de Composición de Alimentos del Centro de Enseñanza Superior de Nutrición y Dietética (CESNID), que recogen la composición de 478 alimentos de consumo habitual en nuestro país, en energía, macronutrientes, vitaminas y minerales ⁽¹⁵⁶⁾. Para detallar el tipo de proteína consumida (animal o vegetal) se utilizaron las tablas de composición de alimentos publicadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) ⁽¹⁵⁷⁾. Además, se detalló la ingesta de otros componentes dietéticos poco frecuentes en estudios epidemiológicos, como son los distintos tipos de fibra. Para obtener la composición de los alimentos en fibra soluble e insoluble (polisacáridos no almidonáceos), así como sus subtipos (hemicelulosas, pectinas, celulosa y lignina), se utilizaron las tablas publicadas por Marlett *et al.* ⁽¹⁵⁸⁾. El

contenido en almidón resistente de los alimentos se obtuvo a partir de tablas de Roberts *et al.*, que reúnen la información procedente de 8 publicaciones científicas ⁽¹⁵⁹⁾. Por último, se incorporó la información detallada de unos 502 compuestos fenólicos, organizados en clases, subclases y familias, procedentes de más de 600 publicaciones científicas, que han sido recopilados, recientemente, por el Instituto Nacional Francés para la Investigación Agronómica, en la base de datos Phenol-Explorer ⁽¹⁶⁰⁾.

4. Valoración del grado de adecuación a las Ingestas Dietéticas de Referencia

La valoración del grado de adecuación a las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR), establecidas para población española, en función de la edad y el sexo, se llevó a cabo utilizando como punto de corte los 2/3 de las mismas ⁽¹⁶¹⁾.

VALORACIÓN ANTROPOMÉTRICA

La medición de la talla en bipedestación se realizó utilizando un estadiómetro con un error de 1 mm (Año Sayol, Barcelona, España). Para ello, se situó al sujeto descalzo, erguido, con los talones juntos, estableciendo contacto con la barra vertical del estadiómetro a la altura de los glúteos y la parte superior de la espalda y con la cabeza situada en el plano de Frankfort (plano horizontal imaginario que se establece, cuando la cabeza se mantiene vertical, entre el punto más alto de la abertura del meato auditivo externo y el punto más bajo del borde orbital inferior). El registro del peso se llevó a cabo utilizando una báscula con una precisión de 100 g (Seca, Hamburgo, España),

con el sujeto descalzo y vestido con ropa ligera. Con estos dos valores, se procedió al cálculo del Índice de Masa Corporal de Quetelet (IMC), dividiendo el peso (kg) entre el cuadrado de la talla (m).

ANÁLISIS BIOQUÍMICO

La extracción sanguínea se llevó a cabo en ayuno de, al menos, 12 horas y siguiendo protocolos estandarizados. Las concentraciones séricas de colesterol total y la fracción de lipoproteínas de alta densidad (HDL), así como los niveles de triglicéridos y glucosa fueron determinados mediante métodos estándar en un laboratorio homologado. La concentración de LDL se calculó a partir la fórmula de Friedewald ($LDL = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{Triglicéridos}/5)$).

Las muestras fueron transportadas refrigeradas y en oscuridad para su adecuada preservación. Tras un máximo de 4 horas tras la extracción, fueron centrifugadas a 3.000 rpm, a 4 ° C y durante 10 minutos y, posteriormente, fraccionadas en alícuotas que se almacenaron a -80 ° C para su posterior análisis.

1. Marcadores de estrés oxidativo

La concentración sérica del marcador de lipoperoxidación malondialdehído (MDA) fue determinada mediante el kit comercial LPO-586 (Bioxytech, Oxis Internacional Inc., Paris, Francia), para lo que las muestras fueron previamente tratadas. La eliminación de las proteínas presentes en el suero se llevó a cabo mediante la adición de 65 µl de ácido tricloroacético al

70% a 450 µl de muestra. Tras precipitar durante una hora en frío, fueron centrifugadas a 3.000 rpm, a 4 ° C y durante 10 minutos. El ensayo se basa en la reacción de una molécula de MDA con dos moléculas del reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol que, tras incubar una hora a 45 ° C, da lugar a un producto coloreado con un pico de absorbancia a 586 nm. La adición de ácido clorhídrico aumenta la especificidad del reactivo por el MDA, reduciendo la detección de hidroxialquenos, como el 4-hidroxinonenal. Este ensayo utiliza 1,1,3,3-tetrametoxipropano como MDA estándar ⁽¹⁶²⁾.

La capacidad antioxidante total (CAT) en suero fue determinada utilizando el kit comercial P40117 (Innoprot, Derio, España), que mide antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos a pH fisiológico. En este método, la adición del reactivo CUPRAC provoca que el ion Cu^{2+} sea reducido a Cu^+ , tanto por pequeñas moléculas como por proteínas presentes en el suero. Este ion reducido se une a un agente cromogénico, dando lugar a un producto altamente coloreado, tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, con un pico de absorbancia a 450 nm. Como estándar utiliza Trolox ®, un derivado de la vitamina E ⁽¹⁶³⁾.

2. Parámetros inmunológicos

La determinación de los parámetros inmunológicos fue llevada a cabo por el Grupo de Inmunología de la Universidad de Oviedo. La capacidad fagocítica de los leucocitos sanguíneos fue cuantificada mediante citometría de flujo utilizando el citómetro BD FACSCanto TM II (Becton Dickinson Biosciences, San Diego, California, EEUU) y utilizando el kit

Phagotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania). La actividad citotóxica de las células NK se determinó mediante lisis específica de células K562 marcadas, y posterior citometría de flujo, utilizando, para ello, el kit Nktest® (Orpegen Pharma). Los niveles séricos de las citocinas IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 y TNF- α fueron cuantificados utilizando el inmunoensayo Multiplex (Becton Dickinson Biosciences) y posterior citometría de flujo, mientras que los del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y PCR se determinaron mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Becton Dickinson Biosciences).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las muestras de heces fueron recogidas dentro de las 2 horas posteriores a su deposición, y adecuadamente tratadas para asegurar su preservación hasta su posterior análisis, llevado a cabo por el Grupo de Probióticos, Prebióticos y Exopolisacáridos del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Las muestras procedentes del grupo de adultos de mediana edad y personas de edad avanzada fueron analizadas mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), mientras que en las procedentes de pacientes de alergia y LES, así como sus respectivos controles, este análisis se completó con la secuenciación del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal.

1. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

La extracción del ADN de las muestras fecales, previamente congeladas a -80°C, se llevó a cabo mediante el kit comercial QIAamp®

DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La posterior cuantificación de las diferentes poblaciones bacterianas (*Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia coccooides*, *Clostridium. leptum*, *Lactobacillus* y *Faecalibacterium prausnitzzi*) se llevó a cabo mediante qPCR en un termociclador Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), y utilizando, para ello, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las curvas de calibración se realizaron con cultivos puros de cepas apropiadas que se hicieron crecer durante la noche bajo condiciones de anaerobiosis. Tras la amplificación, los extractos de ADN obtenidos fueron analizados, y se procedió al cálculo de la cantidad media de microorganismos por cada gramo de peso húmedo de muestra.

2. Secuenciación del ARN ribosomal 16S.

Para llevar a cabo la secuenciación, las muestras fueron rápidamente tratadas tras su recogida, mediante la adición de 30 ml de estabilizador de ARN RNeasy® (Applied Biosystems) a 10 g de muestra. Esta mezcla se homogenizó y se almacenó a -80 ° C hasta su posterior análisis. La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el kit comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Para la amplificación de un fragmento del gen que codifica el ARNr 16S se usó la pareja de cebadores Probio-Uni (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') y Probio-Rev (5'-ATTACCGCGGCTGCT-3')⁽¹⁶⁴⁾, y el termociclador Verity (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 ° C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 ° C, 30 segundos a 55 ° C y 90 segundos a 72 ° C, seguido de 10 minutos a 72 ° C. La integridad de los amplicones se analizó mediante electroforesis en una

estación de trabajo Experion (BioRad, Hertfordshire, Reino Unido). Los productos derivados de la amplificación de las regiones hipervariables del gen ARNr 16S se purificaron por separación electroforética en un gel de agarosa al 1,5%, y mediante un sistema de purificación Wizard® SV Gen PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), seguido de una etapa de purificación mediante perlas de purificación de ADN Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics GmbH, Bernried, Alemania), con el objetivo de eliminar los dímeros de los cebadores. La concentración de ADN de la biblioteca de amplicones se estimó a través del sistema Experion (BioRad). A partir de ésta y del tamaño medio de los amplicones, se calculó la cantidad de fragmentos de ADN por microlitro, y las bibliotecas se diluyeron a 3×10^9 moléculas de ADN por microlitro antes de su amplificación clonal. La PCR de Emulsión se llevó a cabo utilizando Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación de las bibliotecas se realizó con el kit Ion 316™ usando el sistema Ion Torrent PGM (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Tras ello, las lecturas de secuenciación individuales fueron filtradas mediante el programa PGM para eliminar tanto las de baja calidad como las policlonales. Las secuencias coincidentes con el adaptador PGM 3' también se recortaron de forma automática. Todos los datos de calidad, recortados y filtrados, se exportaron como archivos SFF. Estos archivos fueron procesados mediante el programa QIIME versión 1.7.0⁽¹⁶⁵⁾. El control de calidad retuvo secuencias con una longitud entre 150 y 200 pares de bases, con una puntuación media de calidad > 25 . Los homopolímeros de más de 7 pares de bases y las secuencias con cebadores no

coincidentes, fueron omitidos. Con el fin de calcular las medidas de diversidad (índices de diversidad beta y alfa), se definieron las unidades taxonómicas operacionales (OTU) de ARNr 16S en $\geq 97\%$ de homología de secuencia, usando el algoritmo UCLUST⁽¹⁶⁶⁾. Las secuencias quiméricas fueron eliminadas mediante el programa ChimeraSlayer⁽¹⁶⁷⁾. Todas las lecturas fueron clasificadas en el rango taxonómico más bajo posible utilizando QIIME y una base de datos de referencia del *Ribosomal Database Project*⁽¹⁶⁸⁾.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

La determinación de la concentración fecal de los ácidos grasos de cadena corta: acetato, propionato y butirato, fue llevada a cabo mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Un gramo de cada muestra fecal se diluyó (1/10) en solución salina tamponada y se homogeneizó, a máxima velocidad, en un Stomacher LabBlender 400 (Seward Medical, Londres, Reino Unido) durante 4 minutos. Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de las muestras fueron filtrados a través de filtros de 0,2 μm , mezclados con ácido etil butírico 1/10 (2 mg/ml) como patrón interno, y almacenados a -80°C para su posterior análisis. Para la cuantificación de los AGCC se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) conectado a un detector de masas 5973N (Agilent). Los datos fueron recopilados mediante el software ChemStation G1701DA (Agilent). 1 μl de cada muestra se inyectó directamente en el cromatógrafo equipado con una columna capilar HP-Innowax (Agilent), utilizando helio como gas portador y un caudal constante

de 1,5 ml/minuto. La temperatura del inyector se mantuvo a 220 ° C y la relación de separación fue 50:1. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura inicial de la estufa de 120 ° C, 5 ° C/minuto hasta 180 ° C, 1 minuto a 180 ° C y una rampa de 20 ° C/minuto hasta 220 ° C para limpiar la columna. La columna se conectó directamente al detector de masas y la energía de impacto de los electrones se fijó en 70 eV. Los datos recogidos estaban en el rango de 25 a 250 unidades de masa atómica (a 3,25 exploraciones/segundo). Los AGCC fueron identificados por comparación de sus espectros de masa con los presentes en la biblioteca HP Wiley-138 (Agilent), y por comparación de sus tiempos de retención con los de las normas correspondientes (Sigma). Los picos se cuantificaron como la abundancia relativa del recuento iónico total con respecto al patrón interno. La concentración (mM) de cada AGCC se calculó utilizando las ecuaciones de regresión lineal ($R^2 \leq 0,99$) de las curvas de calibración obtenidas, correspondientes a seis concentraciones diferentes.

PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa IBM SPSS versión 19.0 (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL, EEUU). Para todas las variables se comprobó su distribución normal mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov. En aquellos casos en los que no se cumplía este criterio, las variables fueron transformadas logarímicamente. Los resultados se presentaron como media \pm desviación típica en el caso de variables continuas y porcentaje (%) en el caso de variables categóricas. Para examinar la diferencia entre dos variables continuas se utilizó una prueba de

t-Student. Siempre que existió alguna variable de confusión, ésta fue introducida en el análisis estadístico como covariable, utilizando, en este caso, un modelo lineal general y presentando los resultados como media marginal estimada \pm desviación típica. En el caso de variables categóricas, las diferencias se analizaron mediante pruebas de Chi-cuadrado. La asociación lineal entre dos variables se llevó a cabo mediante correlación de Spearman y análisis de regresión lineal. Para todos los análisis, los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando se obtuvieron $p \leq 0,05$. La potencia estadística de los distintos análisis efectuados se calculó utilizando el programa *PS: Power and Sample Size Calculation* versión 3.0.43 (Vanderbilt University, Nashville, TN, EEUU).

RESULTADOS

OBJETIVO 1: Búsqueda de posibles dianas para el futuro diseño de estrategias dietéticas dirigidas a los colectivos en estudio

La identificación de ingestas de nutrientes inferiores a las recomendaciones en el grupo de sujetos de edad avanzada podría ser útil, en un futuro, en la búsqueda de dianas para el diseño de nuevos alimentos funcionales dirigidos a la población anciana. En este sentido, además de la inclusión de probióticos, prebióticos y otras fibras presentes en los alimentos, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de incluir en la dieta de estos sujetos, nutrientes como los ácidos grasos monoinsaturados, ácido fólico, vitamina A, D y E. La evaluación nutricional llevada a cabo en los pacientes de alergia y LES solamente ha permitido identificar ingestas ligeramente inadecuadas para las vitaminas D y E.

- **Publicación 1:** Nuria Salazar, Patricia López, Lorena Valdés, Abelardo Margolles, Ana Suárez, Ángeles M. Patterson, **Adriana Cuervo**, Clara G. de los Reyes-Gavilán, Patricia Ruas-Madiedo, Sonia González y Miguel Gueimonde. “*Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly*”. Journal of the American College of Nutrition. 2013; 32 (6): 399-406.

Aportación personal: la contribución personal en la elaboración de este trabajo incluyó la participación en el reclutamiento de la muestra y la recogida de la información dietética y antropométrica, así como la posterior informatización, procesamiento y análisis estadístico de los datos, y la

elaboración de las tablas y gráficos correspondientes a la evaluación nutricional presentada en este trabajo.

- **Tablas y gráficos adicionales**
 - Adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada
 - Pacientes de alergia y sujetos control
 - Pacientes de LES y sujetos control

PUBLICACIÓN 1

Microbial Targets for the Development of Functional Foods Accordingly with Nutritional and Immune Parameters Altered in the Elderly

Nuria Salazar, PhD, Patricia López, PhD, Lorena Valdés, DVM, Abelardo Margolles, PhD, Ana Suárez, PhD, Ángeles M. Patterson, PhD, Adriana Cuervo, MSc, Clara G. de los Reyes-Gavilán, PhD, Patricia Ruas-Madiedo, PhD, Sonia Gonzalez, PhD, Miguel Gueimonde, PhD

Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, SPAIN (N.S., P.L., L.V., A.M., C.G.R.-G., P.R.-M., M.G.), Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, SPAIN (P.L., A.S., A.M.P., A.C., S.G.)

Key words: microbiota, elderly, immunity, nutritional assessment

Objective: The development of functional foods for microbiota modulation in the elderly constitutes an interesting strategy. However, for such development, specific targets, not just in terms of microbiota but also considering immune and nutritional parameters, should be identified in this population.

Methods: We analyzed the intestinal microbiota and immune parameters in 38 institutionalized elderly (mean 84 years old) and a group of 38 elderly adults (mean 62 years old). Nutritional assessments were also carried out.

Results: The elderly people in this study presented reduced levels of *Faecalibacterium* genus and *Bacteroides* and *Blautia coccoides* groups and increased *Lactobacillus* group, as well as reduced levels of fecal short-chain fatty acids (SCFA) when compared to younger adults. Moreover, they showed higher levels of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-12 as well as the chemokine IL-8. Significant nutritional deficiencies were also observed in the elderly group.

Conclusion: The results obtained in this study suggest potential targets for the development of functional foods for the elderly population.

INTRODUCTION

The continuous increase in life expectancy in affluent countries, with the concomitant increase in the proportion of senior citizens, represents a challenge for modern societies [1,2]. Extending the period of good health in this population would both increase quality of life and reduce health care costs. Therefore, the development of functional foods specifically targeted to this group of individuals may constitute an interesting strategy [3].

In principle, the nutritional needs of the elderly are not different from those of younger adults. However, the efficiency of nutrient absorption may be impaired, which, together with common chewing difficulties and loss of appetite, may alter the nutritional status of seniors. In addition, aging has been related to changes in the immune function, including decreased proliferative responses, reduced natural killer (NK) cell activity, and increased levels of proinflammatory cytokines, among others [4–7]. These alterations in immune function may explain the higher susceptibility of elderly people to disease. In addition, intestinal microbiota has been reported to be affected

by senescence [8–14]. These age-related changes in the composition of the gut microbiota include reduced species diversity, decreased levels of potentially beneficial microorganisms, an increase in facultative anaerobic bacteria, and a decrease in the availability of total short-chain fatty acids (SCFA). These differences provide a rationale for microbiota modulation in the elderly. Nevertheless, geographical differences in the gut microbiota composition in the elderly have been observed [15] and, therefore, prior to the development of food products for the elderly, specific targets in both the microbiota and immune system in this human population should be identified. This is especially relevant because differential effects of probiotics in different population groups have previously been demonstrated [16], suggesting that the targets on the gut microbiota may also be different depending on geographical location.

The field of probiotics and prebiotics represents a promising option for the development of dietary strategies to promote healthy aging. Probiotic human intervention studies have reported modulation of the intestinal microbiota [12] and the immune system in the elderly [17–21]. Effects on gut

Address correspondence to: Miguel Gueimonde. Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, SPAIN. E-mail: mgueimonde@ipla.csic.es

Microbiota Targets for Functional Foods in Elderly

microbiota and immune parameters have also been reported for prebiotics [22,23]. However, very often the specific nutritional needs of the elderly population have not been considered in the formulation of specific food products.

In this work we aimed to identify potential targets for the development of functional foods directed at elderly people, considering not only the immune system and gut microbiota but also nutritional parameters.

SUBJECTS AND METHODS

Volunteers

The study sample included 76 volunteers from Asturias (northern Spain). The elderly group was composed of 38 volunteers living in retirement homes (31 females, 7 males; 77–95 years old, mean 84 years old). A group of 38 middle-aged adults (27 females, 11 males; 57–67 years old, mean 62 years old) living in their own homes was included for comparison. Exclusion criteria were previous diagnosis of cancer, autoimmune or digestive diseases, and consumption of probiotics, prebiotics, or antibiotics during the previous month. Volunteers were mentally and physically able to participate in the study. Ethical approval was obtained from the Regional Ethical Committee of Asturias and an informed written consent was obtained from each volunteer.

Nutritional Assessment

Dietary intake of the elderly group was assessed by determination of the average frequency of each food offered by the institution, which had provided us with the menus, so that estimation of the frequency of food consumption does not depend upon the participants' memories. For the dietetic valuation of the subjects who were living in their own homes, a diet history was taken. Trained dieticians asked each cook about the preparation and amount of ingredients used in each recipe. Methodological

issues concerning dietary assessment have been detailed elsewhere [24]. Food intake was analyzed for energy, macronutrients, and vitamins by using the nutrient food composition tables developed by the Centre for Higher Studies in Nutrition and Dietetics (CESNID). Tables developed by the U.S. Department of Agriculture were used for the composition of antioxidants, minerals, and other compounds.

In addition, anthropometric measures (weight and height) were collected at the time of sampling.

Intestinal Microbiota Analyses

A one-gram of fecal sample was taken for DNA extraction by using the QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as previously described [25]. Quantification of different bacterial populations (*Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia coccoides* group, *Clostridium leptum* group, *Faecalibacterium prausnitzii*, and *Lactobacillus* group) in feces was performed with a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) as described previously [26,27]. Standard curves were made with pure cultures of appropriate strains (*Akkermansia muciniphila* CIP107961, *Bacteriodes thetaiotaomicron* DSMZ2079, *Bifidobacterium longum* NCIMB8809, *Bl. coccoides* DSMZ935, *C. leptum* DSMZ753, *Faecalibacterium prausnitzii* DSMZ17677, and *Lactobacillus gasseri* IPLAIF7/5), which were grown overnight in GAM medium (Nissui Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan), or RCM medium (Oxoid Ltd., Basingstoke Hampshire, UK) without agar for *Faecalibacterium*, under anaerobic conditions. Fecal DNA extracts were analyzed and the mean quantity per gram of fecal wet weight was calculated.

The occurrence of the different bifidobacterial species was determined by qualitative polymerase chain reaction (PCR; UnoCycler, VWR International, Radnor, PA) using previously described primers and conditions (Table 1).

Table 1. Primers and Annealing Temperatures Used in This Study for *Bifidobacterium* Species Detection

Target	Primers	T _m (°C)	Reference
<i>B. longum</i> group	F-TTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCT	65	[47]
	R-GGCTACCCGTCTGAAGCCACG		
<i>B. pseudocatenolatum</i> group	F-GCCGGATGCTCCGACTCCT	64	[47]
	R-ACCCGAAGGCTTGCTCCCGAT		
<i>B. breve</i>	F-AATGCCGGATGCTCCATCACAC	62	[47]
	R-GCCTTGCTCCCTAACAAAAGAGG		
<i>B. adolescentis</i> group	F-CTCCAGTTGGATGCATGTC	55	[48]
	R-CGAAGGCTTGCTCCGAGT		
<i>B. bifidum</i>	F-TGACCGACCTGCCCCATGCT	61	[47]
	R-CCCATCCCACGCCGATAGAAT		
<i>B. dentium</i>	F-ATCCCGGGGTTCGCCT	55	[48]
	R-GAAGGGCTTGCTCCCGA		
<i>B. angulatum</i>	F-CAGTCCATCGCATGGTGGT	55	[48]
	R-GAAGGCTTGCTCCCAAC		

Microbiota Targets for Functional Foods in Elderly

Analysis of SCFA was performed by using gas chromatography–mass spectrometry as previously reported [28].

Immune Measurements

A heparinized whole blood sample was taken from each subject immediately after the nutritional assessment period. The capacity of blood leucocytes to phagocytose *Escherichia coli* was quantified in a FACSCanto II Flow Cytometer (Becton Dickinson, BD Biosciences, San Diego, CA) using the Phagotest kit (Orpegen Pharma, Heildelberg, Germany). For cytotoxic activity, peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation over Ficoll-Histopaque gradients (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway), counted and adjusted to 5×10^6 cells/mL. Then, NK cell activity was determined by specific target lysis of labeled K562 cells by flow cytometry, using the NKTEST kit (Orpegen Pharma).

Levels of serum IL-10, TNF- α , IL-8, IL-17, and IL-12 were quantified using a multiplex immunoassay (Cytometric Bead Array, CBA, BD Biosciences) by flow cytometry. The concentration of transforming growth factor (TGF)- β and C-reactive protein (CRP) was determined by ELISA (BD OptEIA kit, BD Biosciences, and CRP Human Instant ELISA, Ebioscience [San Diego, CA, USA], respectively).

Statistical Analyses

Results were analyzed using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL). The normality of the quantitative data was checked using the Kolmogorov-Smirnov test and the differences between groups were analyzed using analysis of variance or Mann-Whitney U test. The occurrences of the different *Bifidobacterium* species between both groups of volunteers were analyzed by chi-square test. Pearson or Spearman's correlation tests, depending on the normality of the data, were used to determine correlations between microbial and immune variables within each age group.

RESULTS

Nutritional Assessment

Elderly volunteers had a significantly ($p < 0.05$) lower height (154 vs 164 cm) and higher body mass index (28 vs 25 kg/m²) than those in the adult group.

The elderly volunteers presented significantly lower ($p < 0.05$) energy intake and a lower consumption of some nutrients, independent of energy and gender (Table 2). Interestingly, a different behavior was observed among the series of fatty acids in both populations. Though monounsaturated fatty acids intake was significantly lower in the elderly group than in younger adults, the reverse was true for polyunsaturated fatty acids intake. In the elderly group all subjects were below the recommended

Table 2. Mean Daily Intake of Energy, Proteins, Lipids, Vitamins, Minerals, and Phenolic Compounds, According to Age Group^a

	Middle-Aged Adults	Elderly
Energy (kcal)	1928.15 \pm 554.56	1697.04 \pm 387.78*
Protein (g)	89.20 \pm 29.45	88.88 \pm 20.48
Lipids		
SFA (g)	26.05 \pm 10.59	28.82 \pm 7.23
MUFA (g)	33.17 \pm 10.21	26.08 \pm 10.04**
PUFA (g)	7.85 \pm 2.30	17.65 \pm 7.05**
Cholesterol (mg)	291.05 \pm 121.95	308.10 \pm 97.13
CLA	0.001 \pm 0.001	0.018 \pm 0.015**
Vitamins		
β -carotenes (μ g)	4733.90 \pm 3378.73	1337.90 \pm 680.78**
Folic acid (μ g)	432.90 \pm 153.18	286.27 \pm 77.84**
Vitamin A (μ g)	719.50 \pm 271.93	399.01 \pm 122.45**
Vitamin B12 (μ g)	6.82 \pm 3.14	8.84 \pm 2.75*
Vitamin B6 (mg)	2.27 \pm 0.62	1.83 \pm 0.42**
Vitamin C (mg)	229.46 \pm 97.30	149.75 \pm 71.16**
Vitamin D (μ g)	4.00 \pm 2.38	0.79 \pm 0.28**
Vitamin E (mg)	8.29 \pm 2.34	12.77 \pm 5.66**
Minerals		
Copper (mg)	1.29 \pm 0.52	1.19 \pm 0.33
Iron (mg)	12.23 \pm 3.60	12.12 \pm 2.73
Selenium (μ g)	119.67 \pm 43.62	135.96 \pm 35.02*
Zinc (mg)	10.55 \pm 3.75	8.32 \pm 1.80*
Other compounds		
Phenolic compounds (mg)	928.67 \pm 535.99	342.51 \pm 150.57**

SFA = saturated fatty acid, MUFA = monounsaturated fatty acid, PUFA = polyunsaturated fatty acid, CLA = linolenic conjugated acid.

^aValues are mean \pm SD. Energy intake is adjusted by gender and the rest of the nutrients are adjusted by gender and energy intake.

* $p \leq 0.05$. ** $p \leq 0.001$.

daily intake for vitamins A and D, with more than half not reaching the recommended values for folic acid, vitamin E, or copper (Fig. 1). A high number of adults also presented lower intakes of vitamins D and E.

Intestinal Microbiota

The analyses of the intestinal microbiota performed in feces indicated that the elderly presented, in general, lower levels of most of the microbial groups tested; the differences reached statistical significance for *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides*, and *Bl. coccoides* groups. On the contrary, the lactobacilli group and *Akkermansia* genus were present at higher levels, and the differences being statistically significant for the former microorganisms (Table 3).

With regard to the *Bifidobacterium* species composition, no statistically significant differences in the occurrence of any of the species analyzed were found, with the sole exception of *Bifidobacterium adolescentis*, which was detected more often in feces from elderly subjects (Fig. 2). On average, the feces harbored 3 distinct bifidobacteria species, without any difference in the diversity between elderly (3.28 \pm 0.81 species per sample) and middle-aged adults (3.03 \pm 0.91 species).

Microbiota Targets for Functional Foods in Elderly

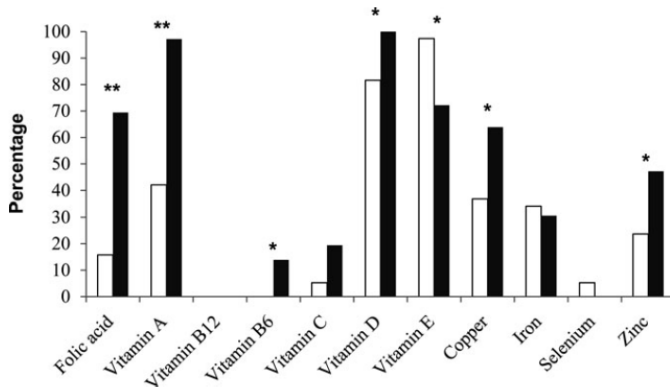


Fig. 1. Percentage of subjects with daily intake of vitamins and minerals below dietary reference intakes [29] in elderly (black columns) and middle-aged adults (white columns). Significant differences between both age groups: * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

The analyses of SCFA evidenced a reduced level of acetate, propionate, butyrate, and valerate, as well as total SCFA, in elderly volunteers compared to those found in the adult group, whereas no differences were observed between both populations for the branched SCFA iso-butyrate and iso-valerate (Fig. 3). Remarkably, elderly volunteers presented a significantly higher ($p < 0.05$) acetate-to-propionate ratio (2.91 ± 0.75 vs 2.41 ± 0.48) in feces. Despite these differences, when the relative abundances of the different SCFAs were compared between both groups, no statistically significant differences were found for acetate (51% in both groups), butyrate (17% and 15% for adults and elderly, respectively), and valerate (3% in both groups), whereas the relative abundance of propionate was significantly lower in the elderly (22% vs 18%).

Immune Parameters

The elderly displayed higher serum levels of several proinflammatory mediators than younger adults ($p < 0.05$; Table 4). In particular, IL-8, an inflammatory chemokine, and IL-12 and

Table 3. Levels of the Different Microbial Groups Analyzed in Feces from Elderly and Middle-Aged Adults Groups (Analysis of Variance)

Microbial Group	Log no. Cells/g (mean \pm SD)		p
	Adults	Elderly	
Bacteroides	9.32 \pm 0.79	8.73 \pm 0.69	0.010
Bifidobacterium	8.06 \pm 0.68	7.68 \pm 1.10	0.085
Akkermansia	6.56 \pm 1.84	7.38 \pm 1.73	0.060
<i>Bl. coccoides</i>	7.44 \pm 1.62	6.14 \pm 1.59	0.001
<i>C. leptum</i>	9.20 \pm 1.36	8.62 \pm 1.91	0.100
<i>Faecalibacterium</i>	8.04 \pm 0.68	7.51 \pm 0.72	0.001
<i>Lactobacillus</i>	5.77 \pm 1.28	7.18 \pm 1.72	0.001

TNF- α , 2 proinflammatory cytokines, were reduced in the elderly. No significant differences, however, were observed for IL-10, IL-17, and TGF- β . With regard to the other immune parameters analyzed (phagocytosis, NK activity, and CRP levels), no differences were found between both groups of volunteers.

Correlations between Immune and Intestinal Microbiota Parameters

With regard to the correlations between microbial levels and immune variables we found that the amount of the proinflammatory cytokine IL-12 was inversely correlated ($p < 0.05$) with the levels of *Lactobacillus* ($r = -0.580$), *C. leptum* ($r = -0.408$), and *Bl. coccoides* ($r = -0.388$) groups and

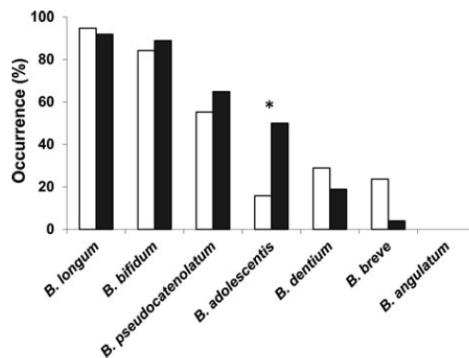


Fig. 2. Occurrence (%) of the different *Bifidobacterium* species analyzed in fecal samples from elderly (black columns) and middle-aged adults (white columns). Significant differences between both age groups: * $p < 0.05$.

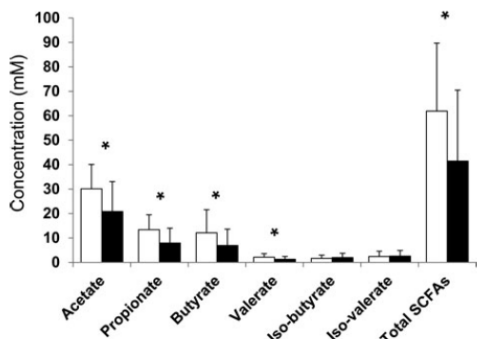


Fig. 3. Concentration of SCFAs (mM) in fecal samples from elderly (black columns) and middle-aged adults (white columns). Significant differences between both age groups: * $p < 0.05$.

tended to negatively correlate with bifidobacteria ($p < 0.1$) in the elderly, whereas *Bl. coccoides* showed a positive correlation with IL-10 ($r = 0.383$, $p < 0.05$). These correlations were not observed in the group of middle-aged adults.

DISCUSSION

Some human populations, such as the elderly, present particular nutritional needs and require nutritionally adapted products, because it has been shown that malnutrition is relatively common in this population and it is associated with a risk of disease [30]. Some nutrients have been linked to a better immune response [31]; among them we found significantly lower intakes of monounsaturated fatty acids, β -carotene, vitamin A, vitamin B6, vitamin C, and vitamin D in the elderly compared to middle-aged adults. Our results point to the interest in supplementation with specific nutrients for which there seems to be a general deficiency in intake in the elderly.

Table 4. Immune Parameters Measured in Both Volunteer Groups (Mann-Whitney U Test)

	Middle-Aged Adults Mean \pm SD	Elderly Mean \pm SD
IL-10 (pg/mL)	0.47 \pm 1.39	0.84 \pm 3.79
TGF- β (ng/mL)	5.53 \pm 1.61	6.81 \pm 5.94
IL-17 (pg/mL)	1.85 \pm 3.37	2.22 \pm 11.57
IL-8 (pg/mL)	8.98 \pm 5.61	22.98 \pm 8.26**
TNF- α (pg/mL)	0.46 \pm 1.99	6.03 \pm 9.33**
IL-12 (pg/mL)	0.12 \pm 1.25	4.47 \pm 9.37*
NK activity (%)	51.74 \pm 13.21	45.53 \pm 21.64
Phagocytic activity (%)	75.43 \pm 20.44	81.23 \pm 20.41
CRP (μ g/mL)	1.38 \pm 1.25	1.24 \pm 1.09

IL = interleukin, TGF = transforming growth factor, TNF = tumor necrosis factor, NK = natural killer, CRP = C-reactive protein.

* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

Different studies have reported changes in the microbiota composition at senescence. Here we observed significantly lower levels of the *Bacteroides*, *Bl. coccoides* (also known as *Clostridium* XIVa group) groups, and *Faecalibacterium* and increased numbers of *Lactobacillus* in the elderly compared to middle-aged adults. In addition, although not significant, a trend toward reduced levels of bifidobacteria and increased *Akkermansia* was found. Reduced levels of *Bacteroides* in the elderly have already been indicated [10], and lower numbers were reported in hospitalized elderly compared to elderly living in the community [32]. In our study, the elderly group lived in retirement homes, which may have further contributed to the differences observed. *Clostridium* XIVa (*Bl. coccoides* group) and IV (*C. leptum* group) have also been reported to be reduced in fecal samples from elderly people compared to younger subjects [9,11,33,34]. With regard to *Akkermansia* the information in literature is still scarce but, in agreement with our observations, slightly higher levels in the elderly have been reported [11], although others found the opposite effect [35]. Interestingly, different studies have evidenced a reduction in fecal levels of *Lactobacillus* with senescence [8,36], whereas other researchers, in accordance with our own results, reported an increase in this microbial group [14,33,34]. In this regard the different methodologies used, culture dependent vs culture independent, may explain these discrepancies.

Reduced levels of bifidobacteria in feces of elderly people have also been reported [8]. Even when these differences were not always found to be statistically significant [11], as in our study, a trend toward a decrease at the end of life seems to exist [37]. It has also been suggested that maybe not just the numbers but rather the composition of the bifidobacterial microbiota is different [36]. In general, the diversity of bifidobacterial species and the occurrence of the different species in our elderly population were analogous to that previously found in similar cohorts when using the same technique [38]; *B. longum* was the species most frequently found. It is worth noting that *B. adolescentis* was the only species whose occurrence showed differences between adults and elderly, where it was higher in the latter group. Interestingly, a negative association between the levels of this species and serum TGF- β has previously been reported [38].

With regard to SCFA, our results confirm previous observations [14] indicating a decrease in the levels of these compounds in fecal samples from the elderly. This has been suggested to be related to a shift from saccharolytic toward putrefactive microbial metabolism [36]. In general, the reductions in fecal SCFA levels correlated well with the microbiota patterns obtained. Thus, the levels of *Clostridium* XIVa group, which includes known butyrate producers such as *Ruminococcus*, were reduced in the elderly. In a similar way, the *Bacteroides* population, which are known propionate producers, decreased in number as also occurred with bifidobacteria, well-known acetate producers, whose levels tended to be lower in the elderly. Interestingly, these shifts in fecal SCFA led to a higher acetate-to-

Microbiota Targets for Functional Foods in Elderly

propionate ratio in the elderly population compared to the group of middle-aged adults. Reducing this ratio has been proposed as a possible indicator of a hypolipidemic effect of prebiotics [39].

Senescence has also been related to a deviation toward a low-grade proinflammatory state [5,6]. Our results emphasize this observation, with elderly institutionalized subjects presenting higher levels of the proinflammatory cytokines IL-12 and TNF- α , as well as the chemokine IL-8, than middle-aged adults. Recently, an increase in proinflammatory cytokines in elderly living in residential care compared to community-living ones has been reported [14]. Our elderly group lived in retirement homes, which may account for some of the differences observed. A reduction in NK activity with aging has been previously found [6], although in our case the lower levels of NK activity observed in the elderly group did not reach statistical significance. The simultaneous analysis of gut microbiota and immune parameters performed in this work allow us to identify an interesting association not previously described. We found that the levels of the proinflammatory cytokine IL-12 were inversely correlated with different microbial groups (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *C. leptum*, and *Bl. coccoides*) in the elderly but not in middle-aged adults, which suggests that the proinflammatory status of the elderly may be partly related to the shifts observed in the gut microbiota pattern. In this sense, it is relevant to comment on the association between the described reduced levels of *Bl. coccoides* and *C. leptum*, in particular, *Faecalibacterium*, groups in the elderly and the maintenance of mucosal homeostasis and prevention of inflammatory bowel disease [40,41], especially because both microbial groups have been reported as inductors of regulatory T cells in the colon [42]. These data support the use of functional foods in aged people, which could help to restore the gut microbiota pattern. There is evidence of supplementation with probiotic strains increasing the levels of *Clostridium* clusters IV and XIVa or *Bifidobacterium* [43]. Indeed, it would be interesting to use certain strains, like *B. bifidum* LMG13195, which has recently been reported as an inductor of functional T regulatory cells [44,45]. These facts underline the possibilities for developing products specifically designated for the elderly population.

In addition to the microbiota and immune differences observed between both volunteer groups, the nutritional assessment carried out allowed the identification of several differences in nutrient intakes between both age groups. Among them, as stated above, we found significantly lower intakes of nutrients important for maintaining the immune function, suggesting the need to supplement functional foods targeted to the elderly with those specific nutrients. These data, together with the identified microbiota and immune aberrancies observed in the elderly, should be considered for the development of functional products targeting at the aged population.

On the other hand, it is also important to point out that most works carried out on intestinal microbiota and immunity in the

elderly compared the profiles of the volunteers with those of a control group formed by young adults. In many cases this means that people born during the first half of the past century, around or soon after the World War II, have been compared with people born in the 1970s to 1980s, when the socioeconomic status of the general population had already improved significantly. This may have led to attributing to aging some effects that may be related to the specific cohorts and the socioeconomic situations in infancy and childhood and for which different epigenetic environments could have been acting [46]. For this reason, in our study we used a group of middle-aged adults instead of a group of young adults for comparison. This may have minimized the differences observed; however, it is likely to have reduced to a certain extent, although not completely avoided, these cohort effects.

CONCLUSIONS

The differences observed in this study between elderly and middle-aged adults constitute potential targets for the development of functional foods directed toward the elderly population. Our data allow us to propose the use of specific probiotics/prebiotics with the ability to restore not only bifidobacteria but also the levels of other anaerobic microorganisms such as the *Bl. coccoides* group, all of which are reduced in the elderly and are promoters of anti-inflammatory and immune regulatory status on the gut mucosa.

The rational selection of probiotics or prebiotics, with appropriate characteristics in terms of microbiota and/or immune modulation, and their inclusion in foods formulated according to the nutritional requirements of the elderly constitutes an opportunity for designing foods with improved characteristics and functionality.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Biopolis SL within the framework of the e-CENIT Project SENIFOOD from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We extend our greatest gratitude to all of the volunteers who participated in the study.

REFERENCES

1. Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW: Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet* 374:1196–1208, 2009.
2. Sanderson WC, Scherbov S: Demography. Remeasuring aging. *Science* 329:1287–1288, 2010.
3. Arbolea S, González S, Salazar N, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M: Development of probiotic products for specific human populations. *Eng Life Sci* 4:1–9, 2012.

Microbiota Targets for Functional Foods in Elderly

4. Candore G, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Lio D, Listi F, Scola L, Vasto S, Caruso C: Immunosenescence and anti-immunosenscence therapies: the case of probiotics. *Rejuvenation Res* 11:425–432, 2008.
5. Candore G, Caruso C, Jirillo E, Magrone T, Vasto S: Low grade inflammation as a common pathogenic denominator in age-related diseases: novel drug targets for anti-ageing strategies and successfully ageing achievement. *Curr Pharm Des* 16:584–596, 2010.
6. Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G: Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiol (Beth)* 23:64–74, 2008.
7. Vallejo AN: Immunological hurdles of ageing: indispensable research on the human model. *Ageing Res Rev* 10:315–318, 2011.
8. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT: Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 48:198–205, 2001.
9. Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y: Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol* 47:557–570, 2003.
10. Woodmansey EJ: Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 102:1178–1186, 2007.
11. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W: Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 5:e10667, 2010.
12. Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N: Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev* 9:107–116, 2010.
13. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW: Composition, variability and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:4586–4591, 2011.
14. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW: Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488:178–184, 2012.
15. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdeneff MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Doré J, Blaut M: Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 72:1027–1033, 2006.
16. Roessler A, Friedrich U, Vogelsang H, Bauer A, Kaatz M, Hipler UC, Schmidt I, Jahreis G: The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clin Exp Allergy* 38:93–102, 2008.
17. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK: Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 74:833–839, 2001.
18. Ouwehand AC, Philipp S: *Bifidobacterium lactis* HN019; the good taste of health. *Agro Food Ind Hi Tech* 15:10–12, 2004.
19. Fukushima Y, Miyaguchi S, Yamano T, Kaburagi T, Lino H, Ushida K, Sato K: Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533). *Br J Nutr* 98:969–977, 2007.
20. Takeda K, Okumura K: Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. *J Nutr* 137:791–793, 2007.
21. Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC: Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:53–59, 2010.
22. Bouhnik Y, Achour L, Paineau D, Riottot M, Attar A, Bornet F: Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutr J* 6:42, 2007.
23. Schiffrin EJ, Thomas DR, Kumar VB, Brown C, Hager C, Van't Hof MA, Morley JE, Guigoz Y: Systemic inflammatory markers in older persons: the effect of oral nutritional supplementation with prebiotics. *J Nutr Health Aging* 11:475–479, 2007.
24. González S, Huerta JM, Alvarez-Uría J, Fernández S, Patterson AM, Lasheras C: Serum selenium is associated with plasma homocysteine concentrations in elderly humans. *J Nutr* 134:1736–1740, 2004.
25. Gueimonde M, Tölkö S, Korpimäki T, Salminen S: New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 70:4165–4169, 2004.
26. Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, Margolles A, de Los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M: Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol* 79:763–772, 2012.
27. Valdés L, Gullón P, Salazar N, Rios-Covián D, González-Muñoz MJ, Parajó JC, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG: Population dynamics of some relevant intestinal microbial groups in human fecal batch cultured with added fermentable xylooligosaccharides obtained from rice husks. *Biore-sources* 8:2429–2441, 2013.
28. Salazar N, Binetti A, Gueimonde M, Alonso A, Garrido P, González del Rey C, González C, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG: Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats. *Int J Food Microbiol* 144:342–351, 2011.
29. Dietary Reference Intakes (DRI) for the Spanish Population-FESNAD 2010. *Act Diet* 14:196–197, 2010.
30. Kuikka LK, Salminen S, Ouwehand AC, Gueimonde M, Strandberg TE, Finne-Soveri UH, Sintonen H, Pitkälä KH: Inflammation markers and malnutrition as risk factors for infections and impaired health-related quality of life among older nursing home residents. *J Am Med Dir Assoc* 19:348–353, 2009.
31. Field CJ, Johnson IR, Schley PD: Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukoc Biol* 71:16–32, 2002.
32. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME: Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and

Microbiota Targets for Functional Foods in Elderly

- effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 70:3575–3581, 2004.
33. Tiihonen K, Tynkkynen S, Ouwehand AC, Ahlroos T, Rautonen N: The effect of ageing with and without non-steroidal anti-inflammatory drugs on gastrointestinal microbiology and immunobiology. *Br J Nutr* 100:130–137, 2008.
 34. Mäkiyuokko H, Tiihonen K, Tynkkynen S, Paulin L, Rautonen N: The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *Br J Nutr* 103:227–234, 2010.
 35. Collado MC, Derrien M, Isolauri E, de Vos WM, Salminen S: Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol* 73:7767–7770, 2007.
 36. Woodmansley EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S: Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 70:6113–6122, 2004.
 37. Gueimonde M, Ouwehand A, Pitkala K, Strandberg T, Finne-Soveri H, Salminen S: Fecal *Bifidobacterium* levels in elderly nursing home patients—are levels as expected? *Biosci Microflora* 29:111–113, 2010.
 38. Ouwehand AC, Bergsma N, Parhiala R, Lahtinen S, Gueimonde M, Finne-Soveri H, Strandberg T, Pitkälä K, Salminen S: *Bifidobacterium* microbiota and parameters of immune function in elderly subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53:18–25, 2008.
 39. Delzene NM, Kok N: Effects of fructan-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* 73:456S–458S, 2001.
 40. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13780–13785, 2007.
 41. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J: Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15:1183–1189, 2009.
 42. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331:337–341, 2011.
 43. Matsumoto M, Aranami A, Ishige A, Watanabe K, Benno Y: LKM512 yogurt consumption improves the intestinal environment and induces the T-helper type 1 cytokine in adult patients with intractable atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 37:358–370, 2007.
 44. López P, González-Rodríguez I, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A: Immune response to *Bifidobacterium bifidum* strains support Treg/Th17 plasticity. *PLoS One* 6:e24776, 2011.
 45. López P, González-Rodríguez I, Sánchez B, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A: Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine* 30:825–829, 2012.
 46. Canani RB, Di Costanzo M, Leone L, Bedogni G, Brambilla P, Cianfarani S, Nobili V, Pietrobelli A, Agostoni C: Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. *Nutr Res Rev* 24:198–205, 2011.
 47. Gueimonde M, Debor L, Tölkö S, Jokisalo E, Salminen S: Quantitative assessment of faecal bifidobacterial populations by real-time PCR using lanthanide probes. *J Appl Microbiol* 102:1116–1122, 2007.
 48. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Kado Y, Takada T, Matsumoto K, Tanaka R: Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:167–173, 2004.

Received November 9, 2012; revision accepted June 24, 2013.

TABLAS Y GRÁFICOS ADICIONALES

1. Adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada

Las características generales de la muestra, no incluidas en la Publicación 1, se presentan en la Tabla 2. De todas las variables evaluadas, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el IMC, más elevado en el grupo de sujetos de edad avanzada. Asimismo, en este grupo se hallaron menores niveles sanguíneos de colesterol total y de la fracción HDL, y mayores de LDL y de MDA.

Tabla 2. Características generales y parámetros sanguíneos, en función de la edad.

	Mediana edad (N = 38)	Edad avanzada (N = 40)
Edad (años)	61,3 ± 2,7	81,8 ± 6,4 **
Género (% hombres)	28,9	22,5
IMC (kg/m²)	25,8 ± 3,4	29,2 ± 4,1 **
Práctica actividad física (%) ^a	78,9	0,0
Hábito tabáquico (%)	26,5	0,0
Parámetros sanguíneos:		
Colesterol total (mg/dl)	231,9 ± 38,0	199,8 ± 38,2 **
Triglicéridos (mg/dl)	116,9 ± 52,7	124,3 ± 49,0
LDL (mg/dl) ^c	150,9 ± 32,7	127,2 ± 32,8 *
HDL (mg/dl) ^d	57,6 ± 13,0	47,7 ± 10,2 **
Glucosa (mg/dl)	97,7 ± 13,4	109,6 ± 37,6
MDA (µM) ^e	2,0 ± 0,5	2,7 ± 0,4 **
CAT (mM) ^f	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1

^a Caminar durante, al menos 30 min/d y/o practicar algún tipo de deporte. IMC: índice de masa corporal; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL; lipoproteínas de alta densidad; MDA: malondialdehído; CAT: capacidad antioxidante total. Resultados procedentes de una prueba t de Student, en el caso de las variables continuas, y Chi-cuadrado en las variables categóricas. Datos presentados como media ± desviación típica y porcentaje. * p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,001

La ingesta media de los principales grupos de alimentos, en función de la edad, se muestra en la Tabla 3. El grupo de personas de edad avanzada

se caracterizó por una mayor ingesta de azúcares, pescados y mariscos, e inferior de bebidas alcohólicas, frutas, verduras y hortalizas, en comparación con los sujetos más jóvenes.

Tabla 3. Ingesta media de los principales grupos de alimentos analizados, en función de la edad.

	Mediana edad (N = 38)	Edad avanzada(N = 40)
Aceites y grasas (g/d)	25,3 ± 10,7	20,2 ± 12,1
Azúcares (g/d)	3,9 ± 5,4	10,2 ± 14,2 *
Bebidas alcohólicas (g/d)	138,7 ± 170,1	1,5 ± 9,2 **
Bebidas no alcohólicas (g/d)	110,0 ± 125,4	114,8 ± 130,5
Carnes (g/d)	107,4 ± 58,3	110,9 ± 41,8
Cereales (g/d)	175,3 ± 125,7	139,3 ± 58,9
Frutas (g/d)	408,6 ± 295,3	167,9 ± 136,9 **
Huevos (g/d)	15,7 ± 10,8	11,8 ± 7,3
Lácteos (g/d)	503,2 ± 254,5	406,2 ± 180,9
Legumbres (g/d)	19,6 ± 22,7	14,8 ± 10,5
Pescado y marisco (g/d)	75,4 ± 48,2	98,6 ± 39,2 *
Verduras y hortalizas (g/d)	219,8 ± 186,2	106,3 ± 70,7 **
Patatas (g/d)	37,8 ± 48,1	50,3 ± 25,2

Resultados procedentes de una prueba t de Student. Datos presentados como media ± desviación típica. * p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,001

La evaluación nutricional presentada en la Publicación 1 se completa con la ingesta media de carbohidratos, lípidos totales, proteína animal y vegetal, fibra dietética total (polisacáridos no almidonáceos) y los subtipos soluble e insoluble, almidón resistente y polifenoles totales y sus respectivas subclases (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos y otros polifenoles) (Tabla 4). Como se puede observar, los sujetos de edad avanzada presentaron una ingesta inferior de todos los componentes evaluados, con la excepción de las proteínas animal y vegetal y los lignanos, con valores similares entre ambos grupos.

Tabla 4. Ingesta de carbohidratos, lípidos totales, proteína animal y vegetal, fibra y polifenoles, en función de la edad.

	Mediana edad (N = 38)	Edad avanzada (N = 40)
Carbohidratos (g/d)	184,0 ± 82,7	185,8 ± 41,8
Lípidos totales (g/d)	72,5 ± 22,4	77,8 ± 21,3
Proteína animal (g/d)	60,6 ± 24,4	59,2 ± 16,8
Proteína vegetal (g/d)	26,2 ± 13,5	28,3 ± 6,4
Fibra total (g/d) ^a	17,3 ± 7,1	12,6 ± 4,3 **
Fibra soluble	3,1 ± 1,4	2,2 ± 0,8 **
Fibra insoluble	14,2 ± 5,8	10,3 ± 3,6 **
Almidón resistente (g/d)	5,1 ± 3,0	4,0 ± 1,2 *
Polifenoles totales (mg/d)	2.240,9 ± 1.057,7	743,7 ± 564,7 **
Flavonoides	457,2 ± 281,5	223,3 ± 179,9 **
Ácidos fenólicos	160,7 ± 164,5	106,5 ± 88,3 **
Lignanós	1,0 ± 0,4	0,1 ± 0,2
Estilbenos	2,2 ± 2,8	0,1 ± 0,0 **
Otros polifenoles	13,9 ± 10,9	1,8 ± 3,4 **

^a Polisacáridos no almidonáceos. Resultados procedentes de un modelo lineal general ajustado por sexo y energía. Datos presentados como media marginal estimada ± desviación típica.
* p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,001

El Gráfico 2 representa el perfil calórico medio de los adultos de mediana edad y los sujetos de edad avanzada, en comparación con los objetivos nutricionales establecidos para la población española. Como es habitual en los países occidentales, el porcentaje de la energía procedente de los carbohidratos no alcanzó el 50-55% recomendado, mientras que, por el contrario, el procedente de proteínas y lípidos fue superior a las recomendaciones, en ambos grupos de sujetos. En los adultos de mediana edad, un 3% de la energía consumida fue proporcionada por el alcohol. El perfil lipídico medio de los adultos de mediana edad y los sujetos de edad avanzada, en comparación con los objetivos nutricionales para la población española, se representa en el Gráfico 3. Los sujetos de mediana edad alcanzaron el objetivo establecido para los AGM, aunque la proporción de

ácidos grasos saturados (AGS) se encontró por encima de los valores recomendados, en detrimento de los AGP. Por el contrario, los sujetos de edad avanzada satisfacen la proporción de AGP, pero se alejan de los valores recomendados para los AGS y AGM.

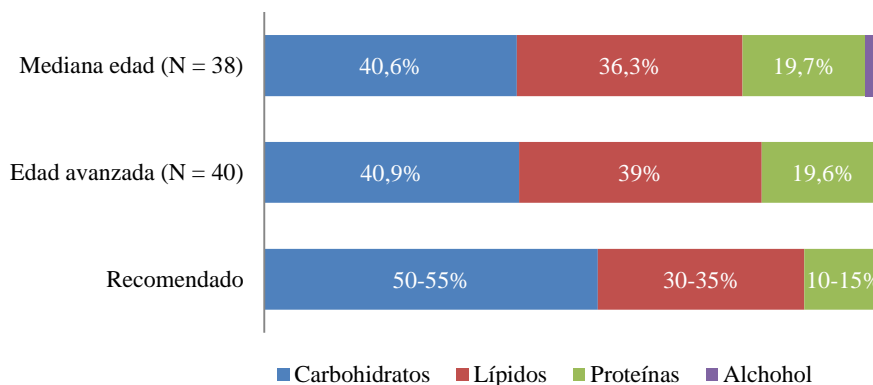


Gráfico 2. Perfil calórico medio en adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada, en comparación con los objetivos nutricionales fijados por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) ⁽¹⁶⁹⁾.

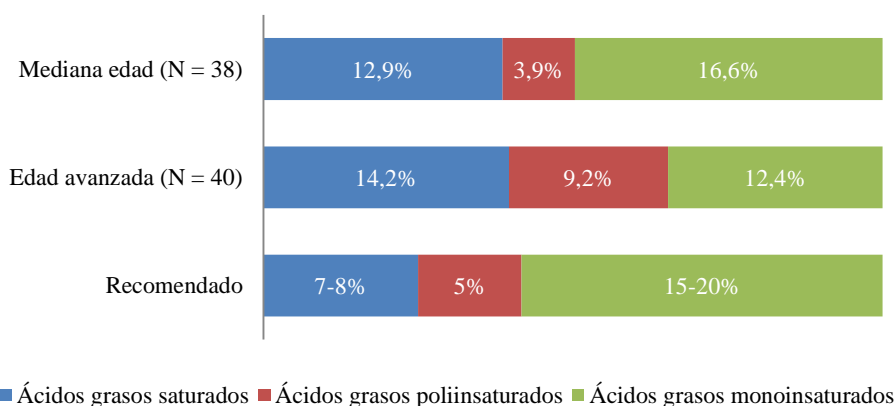


Gráfico 3. Perfil lipídico medio en adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada, en comparación con los objetivos nutricionales fijados por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) ⁽¹⁶⁹⁾.

2. Pacientes de alergia y sujetos control

La edad media, distribución de sexos, IMC, variables relacionadas con el estilo de vida y parámetros sanguíneos, de los pacientes de alergia y sus controles se muestran en la Tabla 5. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas, con la excepción del nivel medio de glucosa sanguínea, superior en el grupo de alérgicos.

Tabla 5. Características generales y parámetros sanguíneos en pacientes de alergia y sujetos control.

	Alérgicos (N = 23)	Controles (N = 22)
Edad (años)	39,4 ± 11,3	39,2 ± 9,5
Género (% hombres)	43,5	31,8
IMC (kg/m²)	26,3 ± 3,9	25,0 ± 3,6
Práctica actividad física (%) ^a	34,8	27,3
Hábito tabáquico (%)	13,0	22,7
Parámetros sanguíneos:		
Colesterol total (mg/dl)	181,6 ± 37,2	199,5 ± 41,5
Triglicéridos (mg/dl)	78,3 ± 32,3	91,1 ± 61,9
LDL (mg/dl)	109,6 ± 37,2	121,5 ± 34,1
HDL (mg/dl)	56,8 ± 8,4	59,6 ± 14,1
Glucosa (mg/dl)	95,5 ± 9,8	88,6 ± 8,6 *
MDA (µM)	2,8 ± 0,3	2,8 ± 0,4
CAT (mM)	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
PCR (µg/ml)	2,0 ± 1,8	2,1 ± 2,0

^a Caminar durante, al menos 30 min/d y/o practicar algún tipo de deporte. IMC: índice de masa corporal; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL; lipoproteínas de alta densidad; MDA: malondialdehído; CAT: capacidad antioxidante total; PCR: proteína C reactiva. Resultados procedentes de una prueba t de Studen, en el caso de las variables continuas, y Chi-cuadrado en las variables categóricas. Datos presentados como media ± desviación típica y porcentaje. * p ≤ 0,05

El consumo medio de los principales grupos de alimentos evaluados, en pacientes de alergia y sujetos control, se presenta en la Tabla 6. En general, la ingesta de alimentos fue similar en ambos grupos, detectando, solamente, un menor consumo de verduras y hortalizas en los alérgicos.

Tabla 6. Ingesta media de los principales grupos de alimentos analizados, en pacientes de alergia y sujetos control.

	Alérgicos (N = 23)	Controles (N = 22)
Aceites y grasas (g/d)	21,7 ± 9,2	28,96 ± 16,1
Azúcares (g/d)	25,5 ± 17,1	15,8 ± 16,9
Bebidas alcohólicas (g/d)	189,5 ± 279,6	110,7 ± 163,2
Bebidas no alcohólicas (g/d)	355,2 ± 254,9	440,3 ± 424,3
Carnes (g/d)	150,9 ± 50,9	125,0 ± 38,7
Cereales (g/d)	166,7 ± 65,8	189,7 ± 67,8
Frutas (g/d)	298,8 ± 198,5	215,3 ± 139,1
Huevos (g/d)	20,0 ± 6,0	21,4 ± 15,8
Lácteos (g/d)	376,4 ± 155,2	405,8 ± 222,3
Legumbres (g/d)	30,3 ± 19,1	43,3 ± 29,4
Pescado y marisco (g/d)	87,9 ± 75,1	76,8 ± 37,9
Verduras y hortalizas (g/d)	169,6 ± 111,1	261,4 ± 165,0 *
Patatas (g/d)	35,6 ± 7,4	38,8 ± 8,3

Resultados procedentes de una prueba t de Student. Datos presentados como media ± desviación típica. * p ≤ 0,05

La ingesta media de energía, macronutrientes, vitaminas, minerales fibra dietética y polifenoles, en pacientes de alergia en comparación con sus respectivos controles se presenta en la Tabla 7. Como se puede observar, de todas las variables evaluadas, sólo encontramos diferencias significativas en la ingesta de AGM y lignanos, inferior en el grupo de alérgicos.

El porcentaje de sujetos cuya ingesta diaria de vitaminas y minerales no alcanza los valores recomendados para la población española, se representa en el Gráfico 4. En general, ambos grupos presentan una buena adecuación a las recomendaciones, con la excepción de las vitaminas D y E, con, aproximadamente, la mitad de la muestra por debajo de los valores recomendados.

Tabla 7. Valores medios de la ingesta diaria de energía, macronutrientes, vitaminas, minerales, fibras y polifenoles, en pacientes de alergia y sujetos control.

	Alérgicos (N = 23)	Controles (N = 22)
Energía (kcal/d) ^a	1.995,8 ± 429,1	2.187,5 ± 565,2
Proteínas totales (g/d) ^{a, b}	100,2 ± 22,2	98,0 ± 24,1
Proteína animal	70,7 ± 18,3	63,9 ± 19,0
Proteína vegetal	27,6 ± 8,7	32,0 ± 14,3
Carbohidratos (g/d) ^{a, b}	226,8 ± 55,0	215,8 ± 58,0
Lípidos totales (g/d) ^{a, b}	79,0 ± 21,8	88,0 ± 4,3
AGS (g/d)	25,9 ± 8,2	26,9 ± 10,4
AGM (g/d)	33,0 ± 8,2	38,2 ± 16,7 *
AGP (g/d)	13,5 ± 6,9	15,519 ± 9,319
Colesterol (mg/d) ^{a, b}	352,1 ± 128,1	303,3 ± 98,6
Vitaminas ^{a, b}		
β-caroteno (μg/d)	3.181,6 ± 20,7	3.819,8 ± 4.892,8
Ácido fólico (μg/d)	349,2 ± 110,1	381,0 ± 126,2
Vitamina A (μg/d)	884,4 ± 507,5	818,1 ± 579,0
Vitamina B₁₂ (μg/d)	9,5 ± 4,9	7,2 ± 3,9
Vitamina B₆ (mg/d)	2,4 ± 0,6	2,3 ± 0,6
Vitamina C (mg/d)	157,0 ± 76,4	143,6 ± 68,8
Vitamina D (μg/d)	3,3 ± 1,8	3,7 ± 1,8
Vitamina E (mg/d)	11,1 ± 5,3	11,4 ± 4,8
Minerales ^{a, b}		
Cobre (mg/d)	1,7 ± 1,3	1,4 ± 0,4
Hierro (mg/d)	15,7 ± 5,4	15,1 ± 5,2
Selenio (μg/d)	125,3 ± 43,4	122,3 ± 35,3
Cinc (mg/d)	11,2 ± 3,1	10,9 ± 3,0
Fibra total (g/d) ^{a, b, c}	16,0 ± 6,8	17,6 ± 8,1
Fibra soluble	2,7 ± 1,2	2,6 ± 1,0
Fibra insoluble	13,3 ± 5,6	14,9 ± 7,1
Almidón resistente (g/d) ^{a, b}	4,1 ± 1,5	5,0 ± 2,0
Polifenoles totales (mg/d) ^{a, b}	1.713,8 ± 699,6	1.629,0 ± 855,5
Flavonoides	428,3 ± 259,9	383,4 ± 350,7
Ácidos fenólicos	333,2 ± 210,5	307,4 ± 262,2
Lignanós	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,5 *
Estilbenos	1,6 ± 2,8	0,6 ± 0,8
Otros polifenoles	2,0 ± 1,7	1,3 ± 1,4

Resultados procedentes de un modelo lineal general ajustado por ^a edad, sexo y ^b energía.

^c Polisacáridos no almidonáceos. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. Datos presentados como media marginal estimada ± desviación típica. * p ≤ 0,05

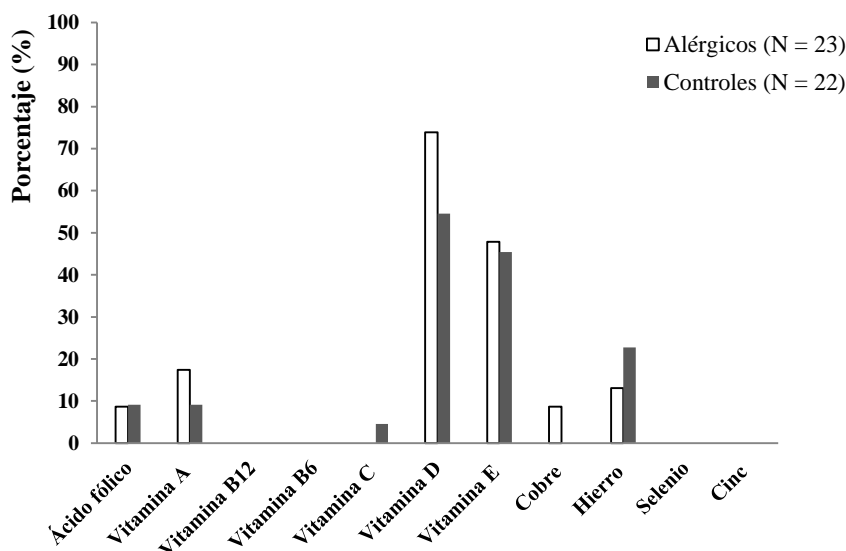


Gráfico 4. Porcentaje de sujetos cuya ingesta de vitaminas y minerales no alcanza los 2/3 de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para población española ⁽¹⁶¹⁾.

En el Gráfico 5 se representa el perfil calórico medio de los pacientes de alergia y sus respectivos controles, en comparación con objetivos nutricionales para la población española. En ambos grupos, la proporción de carbohidratos y proteínas en la dieta se alejó de las recomendaciones. En relación a los lípidos, se observaron diferencias inter-grupales, ya que mientras el grupo de alérgicos presentó un buen ajuste, en los controles la proporción superó el 30-35% recomendado. La contribución del alcohol a la ingesta energética fue baja en ambos casos: un 4% y un 2% en alérgicos y controles, respectivamente. El perfil lipídico medio de los pacientes de alergia y sus controles, en comparación con los objetivos nutricionales para la población española, se presenta en el Gráfico 6. En ambos grupos, el porcentaje de la energía procedente de los AGS se encontró por encima de

los valores recomendados, mientras que los AGP y AGM presentaron un buen ajuste.

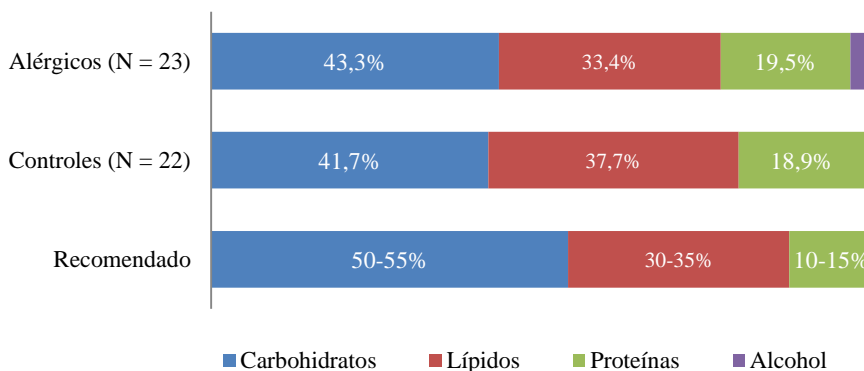


Gráfico 5. Perfil calórico medio en pacientes de alergia y sujetos control, en comparación con los objetivos nutricionales fijados por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) ⁽¹⁶⁹⁾.

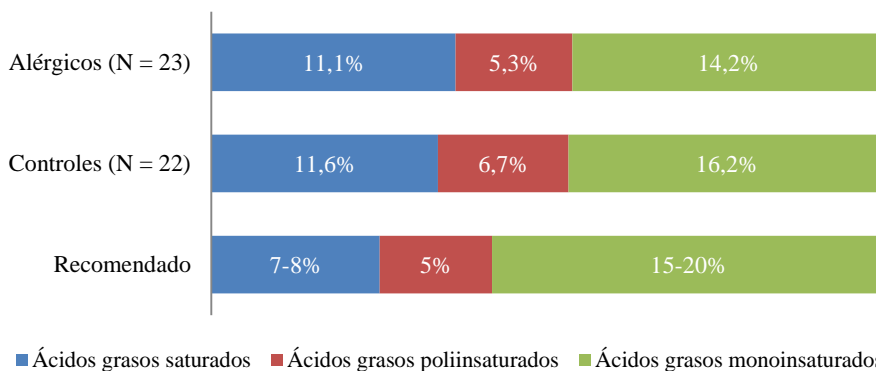


Gráfico 6. Perfil lipídico medio en pacientes de alergia y sujetos control, en comparación con los objetivos nutricionales fijados por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) ⁽¹⁶⁹⁾.

3. Pacientes de LES y sujetos control

Al evaluar las características generales de la muestra de pacientes de LES en comparación con sus controles, encontramos que ambos grupos son similares en relación al IMC, estilo de vida y parámetros sanguíneos (Tabla 8). Esta homogeneidad también se observó en la ingesta de los principales grupos de alimentos evaluados (Tabla 9).

Tabla 8. Características generales y parámetros sanguíneos en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y sujetos control.

	LES (N = 20)	Controles (N = 20)
Edad (años)	49,3 ± 10,7	47,0 ± 8,6
IMC (kg/m²)	26,1 ± 5,3	25,2 ± 4,1
Sedentarismo (%) ^a	45,0	30,0
Hábito tabáquico (%)	40,0	45,0
Parámetros sanguíneos:		
Colesterol total (mg/dl)	196,1 ± 37,0	202,0 ± 38,4
Triglicéridos (mg/dl)	76,6 ± 33,8	122,4 ± 33,5
LDL (mg/dl)	117,9 ± 37,4	122,4 ± 33,5
HDL (mg/dl)	62,6 ± 15,8	63,9 ± 11,5
Glucosa (mg/dl)	87,8 ± 8,0	92,7 ± 13,2
MDA (µM)	2,9 ± 0,4	2,8 ± 0,5
CAT (mM)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
PCR (µg/ml)	3,8 ± 4,2	2,6 ± 1,9

^a Caminar durante, al menos 30 min/d y/o practicar algún tipo de deporte. IMC: índice de masa corporal; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL; lipoproteínas de alta densidad; MDA: malondialdehído; CAT: capacidad antioxidante total; PCR: proteína C reactiva. Resultados procedentes de una prueba t de Student en el caso de las variables continuas y Chi-cuadrado en las variables categóricas. Datos presentados como media ± desviación típica y porcentaje.

Tabla 9. Ingesta media de los principales grupos de alimentos analizados, en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y en sujetos control.

	LES (N = 20)	Controles (N = 20)
Aceites y grasas (g/d)	27,8 ± 17,9	24,7 ± 9,6
Azúcares (g/d)	20,0 ± 23,6	11,5 ± 13,7
Bebidas alcohólicas (g/d)	84,6 ± 164,2	104,4 ± 146,1
Bebidas no alcohólicas (g/d)	286,0 ± 278,8	402,3 ± 464,5
Carnes (g/d)	145,3 ± 64,0	112,4 ± 43,6
Cereales (g/d)	154,1 ± 84,6	136,0 ± 62,2
Frutas (g/d)	392,6 ± 272,2	310,4 ± 176,1
Huevos (g/d)	26,6 ± 18,1	22,6 ± 15,8
Lácteos (g/d)	470,44 ± 359,7	418,9 ± 200,5
Legumbres (g/d)	50,0 ± 62,7	41,8 ± 28,8
Pescado y marisco (g/d)	116,3 ± 53,4	87,0 ± 39,5
Verduras y hortalizas (g/d)	339,8 ± 169,2	352,6 ± 145,5
Patatas (g/d)	50,3 ± 44,4	39,7 ± 34,3

Resultados procedentes de una prueba t de Student. Datos presentados como media ± desviación típica.

En la Tabla 10 se muestran los valores medios de la ingesta de energía, macronutrientes, vitaminas, minerales, fibra dietética y polifenoles, en pacientes de LES en comparación con sus controles. De todos los componentes dietéticos evaluados, sólo se encontraron diferencias significativas en la ingesta de estilbenos, inferior en el grupo de pacientes de LES.

En el Gráfico 7 se representa el porcentaje de sujetos cuya ingesta diaria de vitaminas y minerales no alcanza los valores recomendados para la población española. Como se puede observar, casi la totalidad de la muestra se adecuó a las recomendaciones establecidas, con la excepción de las vitaminas D y E.

Tabla 10. Valores medios de la ingesta diaria de energía, macronutrientes, vitaminas, minerales, fibras y polifenoles, en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y sujetos control.

	LES (N = 20)	Controles (N = 20)
Energía (kcal/d) ^a	2.189,7 ± 722,4	1.858,5 ± 332,9
Proteínas totales (g/d) ^{a, b}	104,7 ± 27,6	100,9 ± 25,2
Proteína animal	73,7 ± 22,7	63,6 ± 17,9
Proteína vegetal	26,2 ± 11,5	31,7 ± 15,8
Carbohidratos (g/d) ^{a, b}	103,0 ± 75,6	205,7 ± 48,0
Lípidos totales (g/d) ^{a, b}	85,4 ± 41,0	84,3 ± 20,5
AGS (g/d)	25,2 ± 14,1	24,7 ± 6,0
AGM (g/d)	35,9 ± 17,7	35,0 ± 7,7
AGP (g/d)	17,2 ± 9,7	17,5 ± 9,4
Colesterol (mg/d)	323,2 ± 113,2	317,9 ± 88,7
Vitaminas ^{a, b}		
β-caroteno (µg/d)	3.391,1 ± 1.853,1	5.323,1 ± 4.979,5
Ácido fólico (µg/d)	395,6 ± 136,2	445,6 ± 120,6
Vitamina A (µg/d)	794,4 ± 385,5	1081,7 ± 634,4
Vitamina B₁₂ (µg/d)	9,3 ± 4,2	8,7 ± 4,2
Vitamina B₆ (mg/d)	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5
Vitamina C (mg/d)	177,6 ± 98,0	201,4 ± 77,6
Vitamina D (µg/d)	6,6 ± 6,6	4,5 ± 1,9
Vitamina E (mg/d)	13,93 ± 8,2	13,0 ± 3,9
Minerales ^{a, b}		
Cobre (mg/d)	1,4 ± 0,6	1,5 ± 0,5
Hierro (mg/d)	15,4 ± 4,8	15,9 ± 4,4
Selenio (µg/d)	121,4 ± 36,0	117,1 ± 29,8
Cinc (mg/d)	11,3 ± 3,6	11,8 ± 2,6
Fibra total (g/d) ^{a, b, c}	18,1 ± 10,0	20,3 ± 8,5
Fibra soluble	2,8 ± 1,5	3,0 ± 1,1
Fibra insoluble	15,3 ± 8,6	17,4 ± 7,51
Almidón resistente (g/d) ^{a, b}	4,8 ± 1,7	4,0 ± 1,7
Polifenoles totales (mg/d) ^{a, b}	1.719,0 ± 801,1	1.829,3 ± 662,1
Flavonoides	400,1 ± 259,9	436,3 ± 189,7
Ácidos fenólicos	310,9 ± 250,7	333,2 ± 170,1
Lignanós	0,9 ± 0,6	1,0 ± 0,3
Estilbenos	0,3 ± 0,6	1,4 ± 1,8 *
Otros polifenoles	37,9 ± 21,2	44,3 ± 36,8

Resultados procedentes de un modelo lineal general ajustado por ^a edad y ^b energía. ^c Polisacáridos no almidonáceos. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. Datos presentados como media marginal estimada ± desviación típica. * p ≤ 0,05

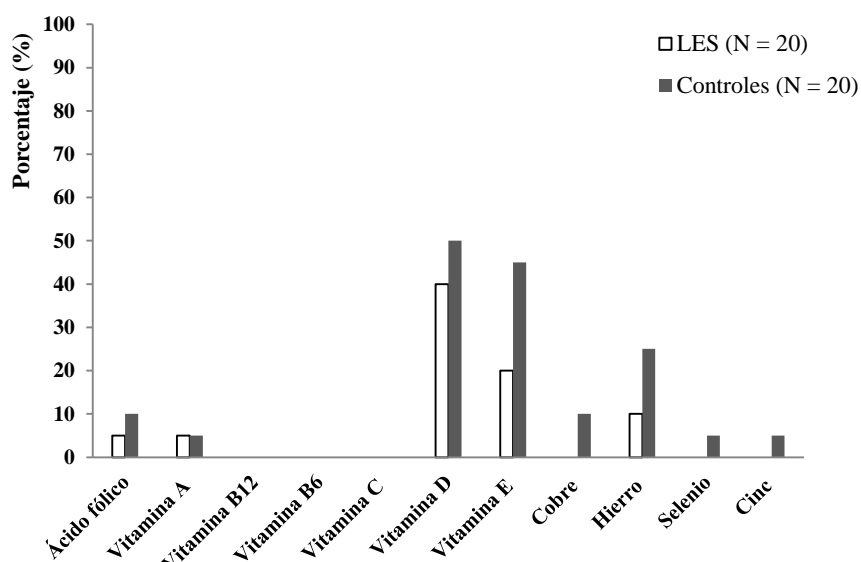


Gráfico 7. Porcentaje de sujetos cuya ingesta de vitaminas y minerales no alcanza los 2/3 de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para población española ⁽¹⁶¹⁾.

El perfil calórico medio de los pacientes de LES y sus controles, en comparación con los objetivos nutricionales para la población española, se representa en el Gráfico 8. En ambos grupos de sujetos, el porcentaje de energía procedente de los carbohidratos fue escaso y, por el contrario, el de lípidos y proteínas fue superior a los valores recomendados. Aproximadamente un 1% de la energía consumida en pacientes de LES y un 2% en controles procedió del alcohol. El Gráfico 9 representa el perfil lipídico medio de los pacientes de LES y sus controles, en comparación con los objetivos nutricionales para población la española. En ambos grupos, el consumo de AGS y AGP fue superior a los valores recomendados, mientras que el de AGM presentó un buen ajuste.

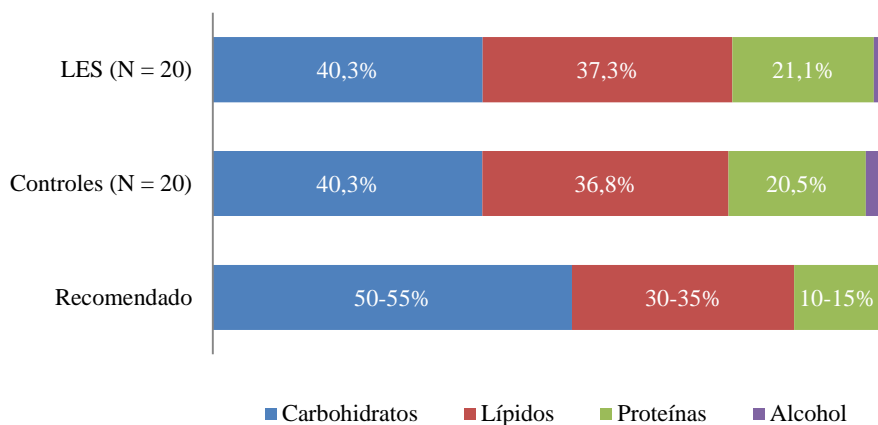


Gráfico 8. Perfil calórico medio en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y sujetos control, en comparación con los objetivos nutricionales fijados por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) ⁽¹⁶⁹⁾.

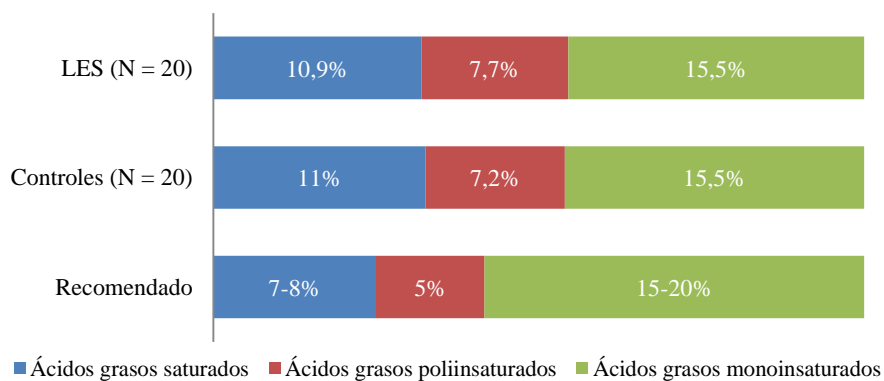


Gráfico 9. Perfil lipídico medio en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y sujetos control en comparación con los objetivos nutricionales fijados por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) ⁽¹⁶⁹⁾.

OBJETIVO 2: *Generar conocimiento acerca de la asociación entre la dieta y la microbiota intestinal.*

El estudio de la asociación entre la dieta y la microbiota intestinal es, hoy día, uno de los campos de estudio de la Nutrición que más atención está recibiendo, dadas las evidencias que apuntan a que este ecosistema podría desempeñar un papel muy importante para la salud del hospedador. La novedad y relevancia de este tema llevó a la realización de una revisión bibliográfica, cuyos principales trabajos al respecto se han recopilado en la siguiente publicación.

- **Publicación 2:** Adriana Cuervo, Silvia Arboleya, Miguel Gueimonde y Sonia González. “*Microbiota modulation by diet in humans. Prebiotics, fibres and other compounds*”. *Agro Food Industry hi-tech*. 2012; 23 (6): XXIII-XXVI.

Aportación personal: la contribución personal a la realización de este trabajo de revisión incluyó la participación en la redacción del manuscrito y en la elaboración de la figura que lo acompaña.

PUBLICACIÓN 2

Microbiota modulation by diet in humans

Prebiotics, fibres and other compounds

ADRIANA CUERVO¹, SILVIA ARBOLEYA², MIGUEL GUEIMONDE², SONIA GONZÁLEZ^{1*}

*Corresponding author

1. University of Oviedo, Department of Functional Biology, Facultad de Medicina, C/ Julián Clavería s/n, Oviedo, Asturias, 33006, Spain

2. Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Paseo Río Linares s/n, Villaviciosa, Asturias, 33300, Spain

KEYWORDS: Prebiotic, fibre, microbiota modulation, functional foods.

ABSTRACT: Based on the relevance of the intestinal microbiota on health, this article is focused on the effect of diet, and its components on modulating the activity of the colonic flora. There are evidences regarding the effects of different prebiotics, as fructo-oligosaccharides (FOS), galact-oligosaccharides (GOS), inulin and resistant starch, on the microbiota modulation and some of its metabolites. In addition, it will be highlighted the importance of other compounds associated with fibre intake, as polyphenols, whose prebiotic/antimicrobial effects remains to be elucidated. Future studies analysing the influence of probiotics and prebiotics on the microbial populations should include a detailed polyphenol intake.

INTRODUCTION

With the increased commercialization of functional foods, which has occurred in the last decades, food with probiotics, prebiotics or both have been used by most of the population. The human gastrointestinal tract (GIT) harbours a very complex and dynamic microbial community which, in number, exceeds by an order of magnitude the number of host cells (1). Different microorganisms and levels are found throughout the gastrointestinal tract, as corresponds with the different ecological niches present from mouth to colon; the stomach and upper bowel being sparsely populated, whilst the colon is heavily colonized. The process of establishment of this microbiota starts at birth and later develops depending on interplay between genetics, environment and diet. This microbiota plays an important role in human health, not only due to its participation in the digestion process, but also for its critical functions on the development of the gut and the immune system. Indeed, it has been demonstrated that this bacterial colonization of the intestine is needed for the development of oral tolerance (2) and for the establishment of the mucosal barrier and the maintenance of intestinal homeostasis (3). The microbiota is also needed for a proper morphological development of the intestine (4) and it regulates host metabolism (5). In addition, it plays an essential role for an adequate immune development (6). On the other hand, the human gastrointestinal tract is one of the largest surfaces of exposure to the outer environment, being an important area of exchange of information with it. There are more lymphoid cells associated with the gastrointestinal mucosa than with the spleen, peripheral lymph nodes and blood, taken together. More than an 80 per cent of the B-cells in the body are gut-associated, making the gut the biggest immune organ (7). Taking into account these considerations, it is obvious that the intestinal microbiota provides the most important contact with the environment for the host and a barrier against harmful food components and pathogenic bacteria. The new molecular techniques have enormously increased our knowledge and helped to determine the community structure of the gut microbiota. They have allowed identifying three human microbiota enterotypes (8). Determining the microbiome of healthy as compared with disease individuals has allowed

identifying aberrancies related to several human diseases and alterations related with different life stages, such as senescence or prematurity. However, most of our microbiota data today are derived from results obtained from faecal samples and, therefore, represent the microbiota present in the colonic lumen. Studies on other intestinal locations, such as the mucosa, are much limited, although differences appear to exist (9) and alterations related with disease have also been observed (10).

EVIDENCES OF STUDIES WITH PREBIOTICS IN HUMANS

A dietary prebiotic is a selectively fermented ingredient that results in specific changes in the composition and/or activity of the gastrointestinal microbiota, thus conferring benefits upon host health (11). Candidate prebiotics must fulfil the following criteria (12): a) resistance to gastric acidity and hydrolysis by mammalian enzymes and gastrointestinal absorption; b) substrate of fermentation by intestinal microorganisms belonging to the human microbiota; c) selective stimulation of the growth and/or activity of intestinal bacteria associated with health and wellbeing. The most studied prebiotic compounds are non-digestible oligosaccharides such as inulin, fructo-oligosaccharides (FOS) and galact-oligosaccharides (GOS), among others.

A large part of research activity has been focused on the selection of compounds able to modify the intestinal microbiota in the colon. However, nowadays there is increased evidence that prebiotics may induce beneficial physiological effects along the gastrointestinal tract (GIT), as well as at systemic level (13).

These include, amongst others:

- *Selective modulation of the intestinal microbiota and improvement of the intestinal functions.*

Gut microbiota is a key player in health and wellbeing, with a composition in which beneficial microorganisms dominate over potentially harmful ones. Bifidobacteria and lactobacilli constitute the traditional target of prebiotics, but other microorganisms, such as *Faecalibacterium prausnitzii*, have also ability to degrade them. Prebiotic consumption has been reported to improve intestinal functions like regularity, intestinal barrier or competitive exclusion of pathogens.

- Immunomodulatory properties.

Prebiotics may influence the immune system directly or indirectly through changes in the microbiota that may affect the immune response of the host. Prebiotics may also bind to receptors of immune cells and participate in the modulation of different immune parameters.

- Stimulation of mineral absorption.

Prebiotics help to increase Ca bioavailability by reducing intestinal pH as consequence of short chain fatty acids (SCFA) production and extending the site of mineral absorption towards the large intestine. The absorption of other minerals, such as Mg or Fe, have also been suggested to be improved too.

- Reduction of risk of disease.

Prebiotics reduce risk of intestinal infections by competitive exclusion, reducing intestinal pH, etc. Compounds with

prebiotic properties have also been reported to promote the endocrine function of the gut, favouring the regulation of lipid metabolism, glycemia and insulin resistance; and food intake and satiety (14).

However, only some of these proposed beneficial effects of prebiotics are backed by human studies. These human studies and RCTs have been performed to evaluate some potential health benefits of prebiotics including: effects on microbiota, immune system, mineral absorption and gastrointestinal disorders (Table 1).

FIBRE INTAKE AND SHORT CHAIN FATTY ACIDS

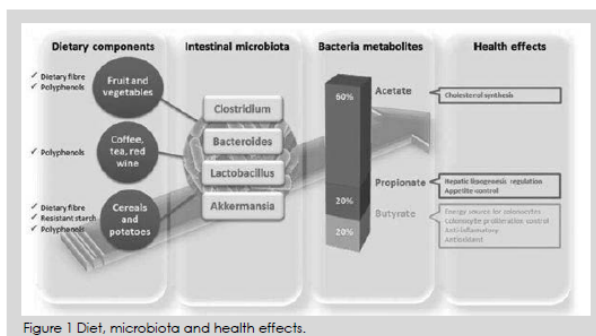
Dietary fibre includes non-starch polysaccharides, oligosaccharides, lignin and resistant starch, compounds that reach the colon without being absorbed in a healthy human gut. Increased consumption of dietary fibre is widely recommended in occidental societies, to improve health. Generous intake of fibre reduces risk for developing some chronic diseases, like coronary heart disease, stroke, hypertension, diabetes or obesity (15). In addition, due to its indigestible nature, these compounds may exert some beneficial effects on the gastrointestinal tract. In this sense, insoluble fibre, like cellulose and lignin, is only fermented to a limited extent in the colon and contributes to increase faecal bulk, enhance gut motility and reduce transit time (15), while soluble fibre, with high fermentability, such as pectin and resistant starch, is associated with the production of the volatile SCFA, together with lactate, CO₂, methane and hydrogen (16). The main SCFA are, in this order, acetate, propionate and butyrate, in a molar ratio of approximately 3:1:1, respectively, in the proximal and distal colon (17).

In recent years, a great number of actions have been attributed to SCFA, whose concentration has been associated with reduced risk of some diseases, such as the irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease, cardiovascular disease and cancer (Figure 1). Numerous studies have pointed to butyrate as a key factor in the maintenance of colon health, being the principal energy source for colonocytes, enhancing normal colonic cell proliferation or exerting antioxidant and anti-inflammatory properties. This has led to consider it as important preventive factor of colon cancer (18). O’Keefe *et al.*, compared the excretion of SCFA in three healthy populations with different nutritional characteristics and different risk level of colon cancer: Native Africans (low risk), African Americans (high risk) and Caucasian Americans (high risk). They found that acetate, propionate and butyrate were higher in Native Africans than in the other two groups. This observation was attributed, by the authors, to their diet rich in whole-grain cereals and resistant starch (19). It is thought that butyrate excretion is mainly due to the fermentation of resistant starch, and there are some studies that confirm this hypothesis.

In a population study carried out by Segal *et al.*, was showed that total SCFA and butyrate excretion levels were greater in native Africans than those in Europeans living locally, despite of the higher intake of total dietary fibre in the latter. This could be due to an increased consumption of resistant starch in the Africans (20). Some dietary intervention works have supported these observations in epidemiological studies. Jenkins *et al.*, in a study conducted in 24 healthy subjects, found higher levels of faecal butyrate with a diet rich in resistant starch (21). However, other authors found that a high intake of resistant starch, not only increases butyrate levels, but also total SCFA and acetate (22).

	Author	Mechanism
Microbiota		Inulin, FOS and GOS are the compounds more tested in human trials able to change the gut flora composition.
	Roberfroid <i>et al.</i> (2010)	AXOS increase the bifidobacteria, decrease the proteolitic fermentation and increase the butyric levels in healthy adults.
	Walton <i>et al.</i> (2012), Cloetens <i>et al.</i> (2010)	
Immune system	Vulevic <i>et al.</i> (2008)	GOS increased phagocytosis, NK cell activity and IL-10; and decreased IL-1, IL-6 and TNF α , in healthy elderly volunteers.
Mineral absorption	Roberfroid <i>et al.</i> (2010)	Calcium absorption was increased by prebiotic consumption in healthy adolescents and postmenopausal women.
GI disorders	Casellae <i>et al.</i> (2007),	Benefits in treating active of pouchitis,
	Lindsay <i>et al.</i> (2006),	Crohn’s disease and ulcerative colitis and a reduction on colon
	Friedman <i>et al.</i> (2000),	cancer risk markers by
	Clark <i>et al.</i> (2012)	prebiotics
Gut infants		Mixture GOS/FOS reduced significantly the frequency of atopic eczema in babies with risk of allergy, and this effect was maintained during two years.
	Osborn <i>et al.</i> (2007), Arslanoglu <i>et al.</i> (2008),	

Table 1. Effects of prebiotic products on human health.



Based on these results, it seems obvious that resistant starch is the main source for butyrate synthesis, however further studies are needed to deepen this association.

Propionate has been related with hepatic lipogenesis regulation, decrease serum and hepatic cholesterol and triglycerides levels, and appetite control (23). Taberero *et al.*, analysing the *in vitro* fermentability of different fibre sources, found that cereal fibre was the main contributor to propionate production (24).

Cereals are rich in β -glucans and arabinoxylans, soluble fibre types which have been associated with propionate synthesis by other authors (25). These scientific evidences could lay the groundwork for the blood lipid modulation by the diet. In this way, the American Heart Association recommends an increased intake of carbohydrates, especially complex carbohydrates and fibre, to prevent cardiovascular disease. Finally, acetate, as well as propionate, is involved in lipid metabolism, being the primary substrate for cholesterol synthesis. Bridges *et al.*, by a dietary intervention, found that acetate serum levels were higher when subjects were fed with a diet rich in oat-bran (26), food with a high content in fermentable fibres. These evidences confirm that, both the type of fibre and the source are important factors to consider. SCFA's synthesis not only depends on diet, but also another factors like number and types of bacteria in the colon and gut transit time (27). In this sense, it has been seen that total SCFA in general and butyrate in particular promotes the growth of lactobacilli and bifidobacteria species, which have been related with an improved health (28).

OTHER COMPOUND: PHYTO-COMPOUNDS

Polyphenols are common constituents of the human diet, present in most food and beverages of plant origin (fruit, vegetables, tea and coffee, red wine, cocoa and olive oil). Apart from their role as antioxidants, the consumption of polyphenols has been suggested to exert diverse benefits, like improving gut health.

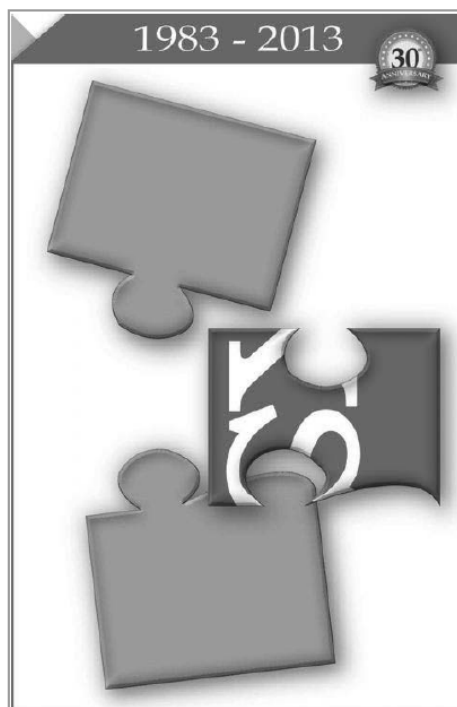
There are few studies in the literature analysing the effect of polyphenols on modulating the human microbiota, and most of them comes from intervention programs performed with isolated polyphenols or polyphenol-rich food or beverages. Recent studies, carried out in animals and human volunteers, revealed that polyphenol-rich food, such as red wine (29) tea (30) or cocoa (31, 32), produce modifications in intestinal bacteria populations. While Queipo-Ortuño *et al.* have recently published changes in the concentration of proteobacteria, fusobacteria, firmicutes and bacteroidetes in humans after consuming alcoholic beverages (red wine and gin) and de-alcoholized red

wine (29), animal studies have found a lower proportion of clostridium and lactobacilli in polyphenol-treated rats versus control ones (33). By other hand, the effects of cocoa flavanols remain controversial: an increase in lactobacilli and bifidobacteria has been described in humans (31), but evidences in animal studies showed a decrease of bacteroides, clostridium and staphilococcus (31). Although the differences in the research that analyses the relation between polyphenols and the microbiota, make them difficult to compare, the evidence seems strong enough to take into account the intake of these phyto-compounds in assessing

the effect of probiotics and prebiotics on intestinal flora. It appears that the stimulatory or antimicrobial effect of polyphenols depends largely on the microbial group. Both the effect on decreasing pathogenic bacteria as increasing the beneficial ones, could contribute in maintaining a balanced microbiota and, hence, in our health.

DIETARY PATTERNS AND MICROBIOTA

Most of the previous research about diet and microbiota has addressed the effect of single food components on different bacterial groups. There are solid evidences that prebiotics, fibre and other dietary compounds affect bacterial populations living in our colon. However, the interrelation between diet and intestinal microbiota is very complex, not only because bacteria are affected by the compounds that reach the colon from the diet,



but also because they produce changes in some of these compounds, so it is important to consider this bidirectional relation. The complex interaction between the different compounds consumed as a part of a whole diet, together with the impact of other factors, as antibiotic use or stress, makes difficult to clarify this association.

Furthermore, the effect of one or more isolated compounds on bacterial populations is not extrapolated to the context of a diet. The combined intake of different food in a diet may modify the effect of the individual components on microbiota, due to the existence of synergies and antagonisms between them. In this sense, Mediterranean diet has been proposed, in recently studies, as a protector risk factor of colon cancer, whilst Western diet characterized by high intake of red and processed meat and refined carbohydrates, have the opposite effect. Some authors propose that the protective effect of Mediterranean diet is due to the combination of food sources with fibre and the intake of other compounds associated, like polyphenols (24). At this point, many questions remains in the air, how much time is necessary to modify the intestinal microbiota by changing food intake?, are the amounts of fibre, prebiotics and phyto-compounds that we consume in a regular diet capable to impact on our flora or it would be necessary the use of supplements?. In this regard, despite of the lack of studies in humans, works conducted in animals showed an increase in firmicutes and a decrease in bacteroidetes phylum by consequence of being fed with a Western diet (34). This ratio firmicutes/bacteroidetes is often used in humans as an indicator of microbial balance.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES OF FUTURE

It is well demonstrated that the intestinal microbiota constitutes an important factor for health and well-being. The rationale for developing strategies aiming at the modulation of the colonic microbiota derives from this demonstration of the importance of microbiota to host health, and these microbiota aberrancies constitute clear targets for the future development of dietary interventions directed to correct them. Now it the time to take advantage of this omics era, because metagenomics are allowing us to know in depth the microbial composition of different human populations and which bacterial groups constitute targets for modulating in different human populations. To this regard, dietary manipulation represents a potential tool

for the rational and directed manipulation of the human intestinal microbiota in the context of the health and disease.

REFERENCES AND NOTES

1. D.C. Savage, *Annu Rev Microbiol.*, **31**, pp. 107-133 (1977).
2. N. Sudo et al., *J Immunol.*, **159**, pp. 1739-1745 (1977).
3. S. Rakoff-Nahoum et al., *Cell.*, **118**, pp. 229-241 (2004).
4. D. Bouskra et al., *Nature*, **456**, pp. 507-510 (2008).
5. F. Backhed, *Ann Nutr Metab.*, **58(Suppl 2)**, pp. 44-52 (2011).
6. H. Chung et al., *Cell.*, **149**, pp. 1578-1593 (2012).
7. P. Brandtzaeg et al., *Gastroenterology*, **97**, pp. 1562-1584 (1989).
8. M.J. Claesson et al., *Nature*, **488**, pp. 178-184 (2012).
9. P. Marreau et al., *Appl Environ Microbiol.*, **67**, pp. 4939-4942 (2001).
10. M. Gueimonde et al., *World J Gastroenterol.*, **13**, pp. 3985-3989 (2007).
11. ISAPP, 6th Meeting of the international scientific association of probiotics and prebiotics. London, Ontario (2008).
12. G.R. Gibson et al., *Nutr Res Rev.*, **17**, pp. 259-275 (2004).
13. M. Roberfroid et al., *Br J Nutr.*, **104(Suppl 2)**, S1-63 (2010).
14. N.M. Delzenne et al., *Microb Cell Fact.*, **10(Suppl 1)**, S10 (2011).
15. J.W. Anderson et al., *Nutr Rev.*, **67(4)**, pp. 188-205 (2009).
16. M.T. Christian et al., *Eur J Clin Nutr.*, **57**, pp. 1486-1491 (2003).
17. D.L. Topping et al., *Physiol Rev.*, **81**, pp. 1031-1064 (2001).
18. H.M. Hamer et al., *Aliment Pharmacol Ther.*, **27**, pp. 104-119 (2008).
19. S.J.D. O'Keefe et al., *J Nutr.*, **139**, pp. 2044-2048 (2009).
20. I. Segal et al., *Dis Colon Rectum.*, **38**, pp. 732-734 (1995).
21. D.J. Jenkins et al., *J Am Coll Nutr.*, **17**, pp. 609-616 (1998).
22. A.L. McOrist et al., *J Nutr.*, **141**, pp. 883-889 (2011).
23. S.H. Al-Lahham et al., *Eur J Clin Invest.*, **40**, pp. 401-407 (2010).
24. M. Tabernero et al., *J Agric Food Chem.*, **59**, pp. 8968-8975 (2011).
25. C. Grootaert et al., *FEMS Microbiol Ecol.*, **69**, pp. 231-242 (2009).
26. S.R. Bridges et al., *Am J Clin Nutr.*, **56**, pp. 455-459 (1992).
27. M.B. Roberfroid *Br J Nutr.*, **93**, pp. 13-25 (2005).
28. L. Bouthillier, *Nutr Clin Pract.*, **21**, pp. 351-366 (2006).
29. M.I. Queipo-Ortuno et al., *Am J Clin Nutr.*, **95**, pp. 1323-1334 (2012).
30. H.C. Lee et al., *Res Microbiol.*, **157**, pp. 876-884 (2006).
31. M. Massot-Cladera et al., *Arch Biochem Biophys* (2012).
32. X. Tzounis et al., *Am J Clin Nutr.*, **93**, pp. 62-72 (2011).
33. P. Dolara et al., *Mutat Res.*, **591**, pp. 237-246 (2005).
34. P.J. Turnbaugh et al., *Sci Transl Med.*, **1**, 6ra14 (2009).

OBJETIVO 2 (a): Valorar la existencia de asociaciones entre la ingesta de alimentos, nutrientes y otros constituyentes de la dieta y la composición de la microbiota intestinal.

Para alcanzar dicho objetivo se prestó especial atención a aquellos componentes de la dieta que, previamente, habían sido asociados con un efecto modulador de este ecosistema, como es la fibra y los polifenoles. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que analizan, de forma detallada, la ingesta de los diferentes tipos de fibras y polifenoles, y la asociación entre estos compuestos y sus principales fuentes alimentarias y la microbiota intestinal. Uno de los hallazgos más relevantes ha sido la identificación de una asociación negativa entre la ingesta de un alimento común en la dieta, como es la naranja, fuente de flavanonas y pectinas, y los niveles de *Blautia coccooides* y *Clostridium leptum* en adultos, así como la asociación positiva entre el pan blanco, rico en hemicelulosas y almidón resistente, y *Lactobacillus*.

En los pacientes de alergia, el consumo de vino tinto, fuente de estilbenos, se relacionó positivamente con la abundancia relativa de *Bacteroides*, y el café, rico en ácidos fenólicos, con *Clostridium*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Al evaluar la asociación entre la dieta y la microbiota intestinal en pacientes de LES, encontramos una asociación positiva entre el consumo de naranja, fuente de flavanonas, y la abundancia de *Lactobacillus*, y entre la manzana, rica en dihidrocalconas, y *Bifidobacterium*; mientras que en sus

controles, el consumo de vino tinto, fuente de dihidroflavonoles, fue positivamente asociado con la abundancia relativa de *Fecalibacterium*.

- **Manuscrito 1: Adriana Cuervo**, Lorena Valdés, Nuria Salazar, Clara G. de los Reyes-Gavilán, Patricia Ruas-Madiedo, Miguel Gueimonde y Sonia González. “*A pilot study of diet and microbiota: interactive associations between fibres and polyphenols with human intestinal bacteria*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, en revision.

Aportación personal: además de la participación en el reclutamiento de la muestra y la recogida de la información relativa a la ingesta dietética, la aportación personal a este trabajo incluyó la informatización, procesamiento y análisis estadístico de los datos, así como la colaboración en la redacción del manuscrito y la elaboración de las tablas y figuras que lo acompañan.

- **Manuscrito 2: Adriana Cuervo**, Arancha Hevia, Patricia López, Ana Suárez, Carmen Díaz, Borja Sánchez, Abelardo Margolles y Sonia González. “*Polyphenols from red wine and coffee are associated with specific intestinal microorganisms in allergic subjects*”.

Aportación personal: la contribución personal a la elaboración de este trabajo incluyó la recogida de la información dietética y antropométrica de la muestra, la posterior informatización, procesamiento y análisis estadístico de los datos, así como la colaboración en la redacción del manuscrito y la confección de las tablas y figuras que muestran los resultados obtenidos.

- **Manuscrito 3: Adriana Cuervo, Arancha Hevia, Patricia López, Ana Suárez, Carmen Diaz, Borja Sánchez, Abelardo Margolles y Sonia González.** *“Polyphenols from oranges and apples are associated with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients”.*

Aportación personal: la participación en este trabajo englobó la recogida de la información dietética y antropométrica de la muestra, la informatización, procesamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos, y la colaboración en la redacción del trabajo, así como la elaboración de las tablas y figuras que lo acompañan.

MANUSCRITO 1

TITLE: A pilot study of diet and microbiota: interactive associations between fibers and polyphenols with human intestinal bacteria.

AUTHORS: Adriana Cuervo¹, Lorena Valdés², Nuria Salazar², Clara G. de los Reyes-Gavilán², Patricia Ruas-Madiedo², Miguel Gueimonde² and Sonia González^{1*}.

¹ Department of Functional Biology, University of Oviedo. Facultad de Medicina, C/Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain.

² Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain.

* Corresponding autor. Tel: +34 985104209; Fax: +34 985103534; E-mail: soniagsolares@uniovi.es

ABSTRACT

Several studies have addressed the use of dietary fibers in the modulation of intestinal microbiota; however, information about other highly correlated components in foods, as polyphenols, is scarce. The aim of this work was to explore the association between the intake of fibers and polyphenols from a regular diet and fecal microbiota composition in 38 healthy adults. Food intake was recorded using an annual food frequency questionnaire (FFQ). Quantification of microbial populations in feces was performed by quantitative PCR. A negative association was found between the intake of pectins and

flavanones from oranges and the levels of *Blautia coccooides* and *Clostridium leptum*. By contrast, white bread, providing hemicellulose and resistant starch, was directly associated with *Lactobacillus*. Since some effects on intestinal microbiota attributed to isolated fibers or polyphenols might be modified by other components present in the same food, future research should be focused on diet rather than individual compounds.

KEYWORDS

Polyphenols, fiber, diet, *Lactobacillus*, microbiota

INTRODUCTION

The human gastrointestinal tract is a very complex ecosystem in which the gut microbiota interplays with host cells and food components. The major bacterial groups of the intestinal microbiota belong to phylum Firmicutes, mainly represented by members of the *Clostridium* clusters XIVa (*Blautia coccooides* group) and IV (*Clostridium leptum* group), and phylum Bacteroidetes. Both phyla are estimated to account for 90% of the overall phylogenetic types¹. The phyla Actinobacteria, mainly members of the *Bifidobacterium* genus, and Verrucomicrobia, mainly represented by the genus *Akkermansia*, as well as other groups such as *Lactobacillus* from Firmicutes, are also important members of the human gut microbiota². This gut microbiota plays a central role in health and disease: a balanced microbiota has been related to the modulation of the immune system, and anti-oxidant defense³, whereas the reduced abundance of some microbial populations appears to be correlated with a health status prone to disease^{4,5}. As food components can modify the microbiota, the interest in food-based strategies able to modulate the composition of human microbiota and their

associated health effects has rapidly increased in recent years. Several studies have addressed the use of dietary fibers and/or probiotics to modify intestinal microbiota⁶. Some types of fibers, such as inulin and fructo-oligosaccharides or resistant starch have repeatedly been shown to increase colonic bifidobacterial numbers⁷⁻⁹. However, available information is still limited as to how other important dietary components, such as polyphenols, can influence gut microbiota^{10,11}. Polyphenols are common constituents of the human diet, being present in most foods and beverages of plant origin¹². To date, few studies have focused on the interactions between polyphenol intake and microbiota: evidence from animal and human studies has shown that supplementation with polyphenol-rich food, such as red wine¹³, tea¹⁴, cocoa¹⁵ or blueberry^{16,17}, modulates some intestinal bacterial populations, but results were not conclusive.

Since cereals, fruits and vegetables contain different mixtures of both fibers and polyphenols¹⁸, results from studies evaluating changes in microbial populations with isolated compounds may be different to what occurs in a physiological context. Giving these evidences, the aim of this study was to explore the association between the intake of fibers and polyphenols coming from a regular diet and fecal microbiota in a cohort of apparently healthy subjects.

MATERIALS AND METHODS

Participants

The study sample involved 38 healthy adults (27 females, 11 males; aged from 55 to 67 years old). Participants were recruited among people attending to the Adult Formation Program in the University of Oviedo. Exclusion criteria were: previous diagnosis of cancer, autoimmune or digestive diseases and consumption

of probiotics/prebiotics or antibiotics during the previous month. Ethical approval was obtained from the Regional Ethics Committee for Clinical Research (Servicio de Salud del Principado de Asturias), in compliance with the Declaration of Helsinki, and an informed written consent was obtained from each volunteer.

Nutritional assessment

Dietary intake was assessed by means of a semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) including 160 items, specifically designed for this study and validated by means of a 24h-recall method for dietary fiber and polyphenol intake. This method allowed the recording of all the foods consumed during the year prior to the beginning of the study. During the interview, each subject was asked, item-by-item, whether they usually ate each food and, if so, how much they usually ate. For this purpose, 3 different serving sizes of each cooked food were presented in pictures to the participants so that they could choose from up to 7 serving sizes (from “less than the small one” to “more than the large one”). For some of the foods consumed, amounts were recorded in household units, by volume, or by measuring with a ruler. It was also collected information about the cooking practices, number and amount of ingredients used in each recipe (e.g., type of oil used, type of milk) and other relevant information for the study, such as the consumption of skin in fruit. Furthermore, it was taken into account the variability in the consumption of some foods, especially fruit and vegetables, according to the season. Methodological issues concerning dietary assessment have been detailed elsewhere ¹⁹. The consumption of foods was converted in energy intake using the nutrient Food Composition Tables developed by the “Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética” ²⁰. The intake

of non-starch dietary fiber, soluble (pectin and hemicellulose) and insoluble types (pectin, hemicellulose, Klason lignin and cellulose) intake in the sample was determined using the Marlett *et al.* Food Composition Tables ²¹. These authors used the enzymatic-chemical method developed by Theander *et al.* ²², by which pectin content is determined using a colorimetric assay, cellulose and hemicellulose by high performance liquid chromatography (HPLC) and Klason lignin is estimated as the insoluble material after a Saeman acid hydrolysis ²³. Resistant starch intake was calculated using the tables published by Roberts *et al.*, which collects information from 8 scientific publications ²⁴, and the consumption of polyphenols in the sample was obtained using the Phenol Explorer Database, which contains information from more than 1,300 publications and mainly determined by HPLC, gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE) ²⁵.

Microbiological analyses

Each volunteer was asked to provide a single fecal sample immediately after the interview for nutrition assessment. Fecal samples were immediately frozen at -80 °C and stored until further analyses. One gram of fecal sample was employed for DNA extraction by using the QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as previously described ²⁶. Quantification of different bacterial populations (*Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia coccooides* group, *Clostridium leptum* group and *Lactobacillus* group) in feces was performed with a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) as previously described ²⁷.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0 (SPSS-Inc., Chicago). Goodness of fit to normal distribution was analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. For descriptive purposes, mean values were presented on untransformed variables. Multiple linear regression analysis was used to investigate the correlations between the intake of fibers and polyphenols and fecal levels of the studied microorganisms. We also introduced age and energy intake as covariates in the models. Since the fibers and polyphenols significantly related to microbiota are usually present in the same foods, multiple stepwise regression models were carried out to explore whether their association with microbial groups remained with independence of covariates and other related variables included in the model. The statistical parameters employed were β (standardized regression coefficient) and R^2 (coefficient of multiple determinations). The conventional probability value (0.05) for significance was used in the interpretation of results. Considering the standard deviation of the microbial levels and the standard deviation of the regression errors, we could reject the null hypothesis with an estimated probability around 0.97 and a Type I error probability of 0.05 for all models in which the slope of the line is above 0.3 [calculated using the software PS: Power and Sample Size Calculation version 3.0.43 (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA)].

RESULTS

General characteristics of the studied human sample are described in Table 1. Results showed that in the diet of the participants prevailed the consumption of dairy products, fruit and vegetables and cereals, with a moderate intake of meat, fish and seafood. Tables 2 and 3 present the mean intake of non-starch and

resistant-starch dietary fibers (types and subtypes) and polyphenols (classes and subclasses), respectively, together with their respective association with intestinal microbial groups. Regarding the fibers, soluble pectin was negatively associated with *B. coccoides* and *C. leptum*. This latter microbial group, which includes important intestinal microorganisms such as *Faecalibacterium prausnitzii* and several *Ruminococcus* species, was also inversely associated with insoluble pectin. On the contrary, a positive association was found between *Akkermansia* and *B. coccoides* levels and resistant starch. *Lactobacillus* was also positively associated with soluble fiber, hemicellulose (soluble and insoluble), cellulose and resistant starch. From all the evaluated polyphenols, only flavanone intake was found to be negatively associated with both *B. coccoides* and *C. leptum* groups.

To explore into these associations, the main food sources of the fibers and polyphenols significantly associated with microbiota, were calculated (Figure 1). Orange consumption was found as the top contributor to insoluble hemicellulose, pectin (soluble and insoluble), cellulose and flavanone intake, whereas white bread was the main food source of soluble hemicellulose and banana was the main supplier of resistant starch.

Multiple stepwise linear regression analyses were carried out to explore the association between the fibers, polyphenols or any of their food sources and the microbiota (Table 4). These dietary components and foodstuffs are highly correlated. Therefore, in order to avoid findings that can be explained by any other highly correlated variable, fibers and polyphenols which appeared in our study as significantly associated with microbiota were placed in a model at the same time. The same approach was used to explore the association between food sources and the microbial groups. *B. coccoides* levels were negatively associated

with orange intake and positively with resistant starch from pasta; *C. leptum* variation was explained, in part, by the intake of flavanones from oranges while *Lactobacillus* was associated with insoluble hemicellulose and resistant starch from white bread.

DISCUSSION

Most research about diet and intestinal microbiota has been traditionally focused on the effect of single food components (usually soluble fibers) acting as prebiotics to promote the growth of some beneficial bacterial groups, such as *Lactobacillus* or *Bifidobacterium*. To the best of our knowledge, this is the first attempt to analyze the impact of the consumption of different types of fibers, together with polyphenols and their dietary sources, on the fecal microbiota, within the context of a regular diet in healthy adults.

The detection of a direct association between dietary fibers provided by white bread and the levels of *Lactobacillus*, as well as the identification of an inverse association between flavanones and pectins coming from orange and *B. coccoides* and *C. leptum*, confirm the complexity of the diet-microbiota interrelation.

Previous studies indicated that pectin evades digestion by human digestive enzymes and reaches the colon, where it is metabolized by several microbial groups, then favoring their growth²⁸. However, in the present study we have found an inverse association between pectin intake and fecal levels of *B. coccoides* and *C. leptum*, which include important groups, such as *Lachnospira*, *Ruminococcus* or *Faecalibacterium*. Since this result was unexpected, we checked the possibility that part of this effect of pectin may be due to its

interaction with other components present in the same foods¹⁸, as is the case of flavanones. It has been recently suggested that the absorption of flavanones takes place both in the small and large bowel, being compounds with a reduced bioavailability²⁹. Also, processing of flavanone-rich foods, such as citrus fruits, can lead to the precipitation of these flavonoids by combination with pectins or other macromolecules³⁰, resulting in compounds with less bioavailability than the original ones³¹. So, given that an appreciable amount of polyphenols pass the small intestine in tandem with dietary fiber^{32,33} and the high grade of correlation between their intake, some authors have suggested that both compounds should be approached together³⁴. In accordance with this, pectin and flavanone intake in our sample were highly correlated ($r = 0.734$ data not shown); oranges were identified as the main contributor to the intake of both dietary compounds, accounting for approximately 45% and 69% of pectin and flavanone intake, respectively. The inclusion of both, pectins, and flavanones, together in a linear regression model revealed that only flavanone intake persists as a predictor of *C. leptum* levels. Therefore, it seems plausible that the inverse association previously reported for pectins may be actually due to their interaction with flavanones. Although no information is currently available on the effect of flavanones on *Clostridium*, *in vitro* experiments conducted by other authors have demonstrated the antimicrobial activity of some flavanones and their metabolites^{35,36}. This antimicrobial activity may be involved in the inverse association with the levels of *B. coccoides* and *C. leptum* groups observed in the present study.

In terms of food consumption, probably the most novel finding of our study was the positive association between the intake of white bread and *Lactobacillus* levels. This genus has been traditionally considered, together with *Bifidobacteria*, as the target of prebiotic action³⁷⁻³⁹. To date, the prebiotic effect

of cereals has been traditionally attributed to whole-grain foods^{40,41}, because of its high fiber content. However, our results reveal that the consumption of refined grains, often undervalued in this regard, could beneficially modulate intestinal microbiota. This data is of great interest since refined foods are the cereals more consumed in western societies (white bread consumption in our sample was 105.68 ± 117.06 g/d). Consistent with this, some authors have also found, in human intervention studies, higher levels of *Lactobacillus* in control subjects that had eaten white bread⁴², thus supporting our results. The hemicellulose content in white bread, which represents about 25.8% of total hemicellulose intake in the sample, could be the basis of the prebiotic effect observed in our study, being consistent with the direct association found between this type of fiber and *Lactobacillus*. In this sense, previous results have demonstrated the ability of arabinoxylans, one of the main cereal hemicelluloses, to positively modulate some beneficial intestinal bacterial groups^{43,44}. Moreover, other components present in white bread could underlie this association, as is the case of resistant starch, directly associated with *Lactobacillus* levels. However, it is important to consider that determining the amount of this compound originating from foods is difficult, since it depends on several factors that are not well standardized in nutritional studies, such as food structure and its processing as well as consumer-related factors, as mastication²⁴. Also, it might be possible that the association between white bread and *Lactobacillus* could be mediated by other foods usually consumed with bread, although we have not found such association between any of these foodstuffs and *Lactobacillus* in our study (data not shown). It is noteworthy the association found between the intake of pasta and *B. coccoides* levels, since the amount of this foodstuff in the diet of the participants is low (9.62 ± 7.92 g/d) and provides only 2% of total resistant starch intake. Nevertheless, our results could be due to the high content of resistant starch in

pasta, being one of its main sources in countries where this food is more frequently consumed ⁴⁵.

Finally, the lack of effect of polyphenol and fiber intake on the fecal levels of other microorganisms, such as *Bacteroides* group, including *Prevotella*, or *Bifidobacterium*, evidenced in our work, do not support the associations previously reported in intervention studies ^{46,47}. At this point, it should be considered that the intake of polyphenols in our sample could be insufficient to influence certain members of the intestinal microbiota and that the mean fiber intake of this study is below the recommended value of 16-24 g/d for non-starch polysaccharides ⁴⁸, 47.4% of the sample being under the acceptable intake of fiber. Some factors related to the content of fibers and polyphenols in foods (plant variety, degree of maturity or cooking, storage and processing practices) are not considered in food composition tables and, consequently, are not taken into account in nutritional studies. Also, polyphenols are compounds submitted to a high variability in their bioavailability, strongly influenced by factors such as food matrix, food processing and microbial metabolism. In addition, although the limited sample size and high inter-individual variability do not allow establishing firm conclusions, our study highlights the complex interactions diet-microbiota and the importance to consider the diet as a whole, rather than isolated components, on such interactions.

In conclusion, our results provide further evidence regarding the relationship between components of a regular a diet and fecal microbiota in healthy adults. The identification of an association between the intake of regular foods, such as oranges or white bread, and certain microbial groups emphasizes the requirement of future research focused on diet rather than on isolated compounds.

ABBREVIATIONS USED

CE: capillary electrophoresis

FFQ: Food frequency questionnaire

GC: gas chromatography

HPLC: High performance liquid chromatography

PCR: Polymerase chain reaction

ACKNOWLEDGMENT

We show our greatest gratitude to all the volunteers participating in the study.

REFERENCES

1. Eckburg, P.B.; Bik, E.M.; Bernstein, C.N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S.R.; Nelson, K.E.; Relman, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **2005**, *308*, 1635-1638.
2. Yatsunenko, T.; Rey, F.E.; Manary, M.J.; Trehan, I.; Dominguez-Bello, M.G.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Baldassano, R.N.; Anokhin, A.P.; Heath, A.C.; Warner, B.; Reeder, J.; Kuczynski, J.; Caporaso, J.G.; Lozupone, C.A.; Lauber, C.; Clemente, J.C.; Knights, D.; Knight, R.; Gordon, J.I. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **2012**, *486*, 222-227.
3. Bosscher, D.; Breynaert, A.; Pieters, L.; Hermans, N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60*, 5-11.
4. Khan, M.T.; Duncan, S.H.; Stams, A.J.; van Dijk, J.M.; Flint, H.J.; Harmsen, H.J. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *ISME. J.* **2012**, *6*, 1578-1585.

5. Sokol, H.; Pigneur, B.; Watterlot, L.; Lakhdari, O.; Bermudez-Humaran, L.G.; Gratadoux, J.J.; Blugeon, S.; Bridonneau, C.; Furet, J.P.; Corthier, G.; Grangette, C.; Vasquez, N.; Pochart, P.; Trugnan, G.; Thomas, G.; Blottiere, H.M.; Dore, J.; Marteau, P.; Seksik, P.; Langella, P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 16731-16736.
6. Cuervo, A.; Arboleya, S.; Gueimonde, M.; González, S. Microbiota modulation by diet in humans. Prebiotics, fibres and other compounds. *Agro. Food Ind. Hi Tec.* **2012**, *23*, 23-26.
7. Petry, N.; Egli, I.; Chassard, C.; Lacroix, C.; Hurrell, R. Inulin modifies the bifidobacteria population, fecal lactate concentration, and fecal pH but does not influence iron absorption in women with low iron status. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 325-331.
8. Yang, J.; Martinez, I.; Walter, J.; Keshavarzian, A.; Rose, D.J.. *In vitro* characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe* **2013**, *23*, 74-81.
9. Yen, C.H.; Kuo, Y.W.; Tseng, Y.H.; Lee, M.C.; Chen, H.L. Beneficial effects of fructo-oligosaccharides supplementation on fecal bifidobacteria and index of peroxidation status in constipated nursing-home residents--a placebo-controlled, diet-controlled trial. *Nutrition* **2011**, *27*, 323-328.
10. Clavel, T.; Fallani, M.; Lepage, P.; Levenez, F.; Mathey, J.; Rochet, V.; Serezat, M.; Sutren, M.; Henderson, G.; Bennetau-Pelissero, C.; Tondeu, F.; Blaut, M.; Dore, J.; Coxam, V. Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2786-2792.
11. Tzounis, X.; Vulevic, J.; Kuhnle, G.G.; George, T.; Leonczak, J.; Gibson, G.R.; Kwik-Urbe, C.; Spencer, J.P. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 782-792.

12. Hervert-Hernández, D.; Goni, I. Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food Rev. Int.* **2011**, *27*, 154-169.
13. Queipo-Ortuño, M.I.; Boto-Ordoñez, M.; Murri, M.; Gómez-Zumaquero, J.M.; Clemente-Postigo, M.; Estruch, R.; Cardona, D.F.; Andres-Lacueva, C.; Tinahones, F.J. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 1323-1334.
14. Lee, H.C.; Jenner, A.M.; Low, C.S.; Lee, Y.K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 876-884.
15. Massot-Cladera, M.; Pérez-Berezo, T.; Franch, A.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *527*, 105-112.
16. Guglielmetti, S.; Fracassetti, D.; Taverniti, V.; Del Bo, C.; Vendrame, S.; Klimis-Zacas, D.; Arioli, S.; Riso, P.; Porrini, M. Differential modulation of human intestinal *Bifidobacterium* populations after consumption of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8134-8140.
17. Vendrame, S.; Guglielmetti, S.; Riso, P.; Arioli, S.; Klimis-Zacas, D.; Porrini, M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12815-12820.
18. Taberero, M.; Venema, K.; Maathuis, A.J.; Saura-Calixto, F.D. Metabolite production during in vitro colonic fermentation of dietary fiber: analysis and comparison of two European diets. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8968-8975.
19. Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. Fibers from regular diet are directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly. *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 811-6.
20. Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética (CESNID). Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en

España. McGraw-Hill; Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona: Barcelona (Spain), 2008.

21. Marlett, J.A.; Cheung, T.F. Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* **1997**, *97*, 1139-1151.
22. Theander, O.; Westerlund, E.A. Studies on dietary fiber, 3: improved procedures for analysis of dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 330-336.
23. Saeman, J.F. Kinetics of wood saccharification: Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Ind. Eng. Chem.* **1945**, *37*, 43-52.
24. Roberts, J.; Jones, G.P.; Rutsihauser, I.; Birkett, A.; Gibbons, C. Resistant starch in the Australian diet. *Nutr. Diet.* **2004**, *61*, 98-104.
25. Neveu, V.; Perez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; Scalbert, A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*. **2010**, bap024.
26. Gueimonde, M.; Tölkö, S.; Korpimäki, T.; Salminen, S. New realtime quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4165-4169.
27. Salazar, N.; López, P.; Valdés, L.; Margolles, A.; Suárez, A.; Patterson, A.M.; Cuervo, A.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Ruas-Madiedo, P.; González, S.; Gueimonde, M. Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly. *J. Am. Coll. Nutr.* **2013**, *32*, 399-406.
28. Shinohara, K.; Ohashi, Y.; Kawasumi, K.; Terada, A.; Fujisawa, T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* **2010**, *16*, 510-515.

29. Borges, G.; Lean, M.E.; Roberts, S.A.; Crozier, A. Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. *Food Funct.* **2013**, *4*, 754-762.
30. Baker, R.; Cameron, R. Clouds of Citrus juice and juice drink. *Food Technol.* **1999**, *53*, 64-69.
31. Gil-Izquierdo, A.; Gil, M.I.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F.A. *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1035-1041.
32. Arranz, S.; Silvan, J.M.; Saura-Calixto, F. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 1646-1658.
33. Mainai, G.; Periago, M.J.; Catasta, G.; Toti, E.; Goñi, I.; Bysted, A.; Granado-Lorencio, F.; Olmedilla, B.; Knuthsen, P.; Valoti, M.; Böhm, V.; Mayer, E.; Behnlian, D.; Schelemer, U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 194-218.
34. Saura-Calixto, F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 43-49.
35. Celiz, G.; Audisio, M.C.; Daz, M. Antimicrobial properties of prunin, a citric flavanone glucoside, and its prunin 6"-O-lauroyl ester. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 1450-1457.
36. Mazimba, O.; Masesane, I.B.; Majinda, R.R. A flavanone and antimicrobial activities of the constituents of extracts from *Mundulea sericea*. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 1817-1823.
37. Christensen, H.R.; Frokiaer, H.; Pestka, J.J. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 171-178.

38. Hedin, C.; Whelan, K.; Lindsay, J.O. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc. Nutr. Soc.* **2007**, *66*, 307-315.
39. Rafter, J.; Bennett, M.; Caderni, G.; Clune, Y.; Hughes, R.; Karlsson, P.C.; Klinder, A.; O'Riordan, M.; O'Sullivan, G.C.; Pool-Zobel, B.; Rechkemmer, G.; Roller, M.; Rowland, I.; Salvadori, M.; Thijs, H.; Van Loo, J.; Watzl, B.; Collins, J.K. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 488-496.
40. Costabile, A.; Klinder, A.; Fava, F.; Napolitano, A.; Fogliano, V.; Leonard, C.; Gibson, G.R.; Tuohy, K.M. Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 110-120.
41. Langkamp-Henken, B.; Nieves, C. Jr.; Culpepper, T.; Radford, A.; Girard, S.A.; Hughes, C.; Christman, M.C.; Mai, V.; Dahl, W.J.; Boileau, T.; Jonnalagadda, S.S.; Thielecke, F. Fecal lactic acid bacteria increased in adolescents randomized to whole-grain but not refined-grain foods, whereas inflammatory cytokine production decreased equally with both interventions. *J. Nutr.* **2012**, *142*, 2025-2032.
42. Walton, G.E.; Lu, C.; Trogh, I.; Arnaut, F.; Gibson, G.R. A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. *Nutr. J.* **2012**, *11*, 36.
43. Neyrinck, A.M.; Possemiers, S.; Druart, C.; Van de Wiele, T.; De Backer, F.; Cani, P.D.; Larondelle, Y.; Delzenne, N.M. Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, *Roseburia* and *Bacteroides/Prevotella* in diet-induced obese mice. *PLoS One* **2011**, *6*, e20944.
44. Van den Abbeele, P.; Gerard, P.; Rabot, S.; Bruneau, A.; El Aidy, S.; Derrien, M.; Kleerebezem, M.; Zoetendal, E.G.; Smidt, H.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T.; Possemiers, S. Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and

luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 2667-2680.

45. Brighenti, F.; Casiraghi, M.C.; Baggio, C. Resistant starch in the Italian diet. *Br. J. Nutr.* **1998**, *80*, 333-341.

46. Jung, C.M.; Heinze, T.M.; Schnackenberg, L.K.; Mullis, L.B.; Elkins, S.A.; Elkins, C.A.; Steele, R.S.; Sutherland, J.B. Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* **2009**, *297*, 266-73.

47. Rodríguez Vaquero, M.J.; Alberto, M.R.; Manca de Nadra, M.C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Contr.* **2007**, *18*, 93-101.

48. Nishida, C.; Uauy, P.; Kumanyika, S. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and prevention of chronic diseases: process, product and policy. *Publ. Health Nutr.* **2004**, *7*, 245-250.

This work was funded by Biopolis SL. within the framework of the e-CENIT Project SENIFOOD from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Food Sources of Pectin (Soluble and Insoluble), Hemicellulose (Soluble and Insoluble), Cellulose, Resistant Starch and Flavanones in the Sample.

A: soluble pectin; B: insoluble pectin; C: soluble hemicellulose; D: insoluble hemicellulose; E: cellulose; F: resistant starch; G: flavanone.

Table 1: General Characteristics of the Human Sample.

	X ± SD	P₅ - P₉₅^a
Energy (kcal/d)	1928.20 ± 554.56	1040.26 - 3313.48
Food groups (g/d):		
Oils and fats ^b	25.33 ± 10.73	10.00 - 50.5
Alcoholic beverages ^c	138.69 ± 170.14	0.00 - 507.18
Non- alcoholic beverages ^d	110.00 ± 125.40	0.00 - 334.68
Meats and derived products ^e	107.38 ± 58.25	34.15 - 211.29
Cereals and derived products ^f	175.32 ± 125.67	30.75 - 385.76
Fruits and derived products ^g	408.61 ± 295.32	134.55 - 1038.70
Eggs ^h	15.70 ± 10.77	0.66 - 44.00
Dairy products ⁱ	503.21 ± 254.53	38.81 - 816.74
Legumes ^j	19.61 ± 22.66	0.00 - 69.89
Fish and seafood ^k	75.40 ± 48.16	9.74 - 175.86
Vegetables and root crops ^l	257.60 ± 186.37	1.37 - 528.56
Dietary fiber (g/d)^m	18.18 ± 7.07	8.11 - 29.21
Resistant starch (g/d)	5.07 ± 2.99	1.37 ± 10.22
Total polyphenols (mg/d)	2341.33 ± 1057.68	1180.66 - 5480.55
Microbial groups (log no. cells/g of feces)		
<i>Akkermansia</i>	6.57 ± 1.84	4.09 – 9.39
<i>B. coccoides</i>	9.32 ± 0.79	7.55 – 10.46
<i>C. leptum</i>	8.06 ± 0.68	6.96 – 9.22
<i>Bacteroides</i>	7.45 ± 1.65	4.00 – 9.54
<i>Bifidobacterium</i>	9.26 ± 1.36	5.52 – 10.46
<i>Lactobacillus</i>	5.77 ± 1.28	4.00 – 9.54

(n = 38). ^a 5th and 95th percentiles. Foods included: ^b oils, margarine and butter; ^c distilled beverages, beer, cider, liquors and wines; ^d coffee, cocoa, infusions, soft drinks and canned juices; ^e fresh white and red meat, sausages and ham; ^f breakfast cereals, biscuits, grains and flours, breads, pasta and pastries; ^g fresh, dried and canned fruit; ^h chicken eggs; ⁱ milk, ice-cream, dairy desserts, cheese, yogurt and fermented milks; ^j fresh, dried and canned legumes; ^k fresh lean and fat fish, fresh crustaceans and mollusks and canned seafood; ^l fresh and canned mushrooms and vegetables and potatoes. ^m Non-starch polysaccharides.

Table 2: Daily Intake of Types and Subtypes of Non-starch Dietary Fiber and Resistant Starch, and its Association with the Quantification of Microbial Groups (log no. cells/g feces).

	Intake (g/d)	<i>Akkermansia</i> ^a		<i>B. coecoides</i> ^a		<i>C. leptum</i> ^a		<i>Bacteroides</i> ^a		<i>Bifidobacterium</i> ^a		<i>Lactobacillus</i> ^a	
		R ²	β	R ²	β	R ²	β	R ²	β	R ²	β	R ²	β
Dietary fiber (NSP)													
Soluble fiber	3.28 ± 1.41	0.018	0.012	0.061	-0.205	0.034	0.030	0.022	0.053	0.091	0.218	0.173	0.481*
Hemicellulose	1.97 ± 0.97	0.032	-0.189	0.062	0.217	0.137	0.486	0.021	0.010	0.143	0.409	0.443	0.924*
Pectin	1.21 ± 0.73	0.052	0.191	0.173	-0.408*	0.141	-0.369*	0.023	0.053	0.084	-0.135	0.105	-0.215
Insoluble fiber	14.90 ± 5.76	0.028	-0.125	0.046	-0.091	0.034	-0.029	0.023	-0.065	0.071	0.054	0.139	0.369
Cellulose	5.40 ± 2.00	0.028	-0.124	0.043	0.055	0.036	0.071	0.025	-0.084	0.080	0.134	0.190	0.459*
Hemicellulose	4.57 ± 1.90	0.036	-0.167	0.044	0.067	0.036	0.071	0.034	-0.149	0.071	0.057	0.182	0.437*
Pectin	2.49 ± 1.45	0.031	0.117	0.174	-0.408*	0.132	-0.353	0.021	0.020	0.074	-0.078	0.087	-0.152
Klason lignin	2.44 ± 1.24	0.056	-0.257	0.048	0.107	0.074	0.276	0.024	0.069	0.075	0.100	0.174	0.442
Resistant starch		0.174	0.397*	0.162	0.404*	0.069	0.262	0.022	-0.037	0.127	0.228	0.226	0.429*

(n = 38).^a Based on multiple regression analysis adjusted by age and energy intake.

β: standardized regression coefficient, R²: coefficient of multiple determinations. * p ≤ 0.05

Table 3: Daily Intake of Classes and Subclasses of Polyphenols and its Association with the Quantification of Microbial Groups ^a.

	Intake (mg/d)	<i>Akkermansia</i> ^b		<i>B. coccoides</i> ^b		<i>C. leptum</i> ^b		<i>Bacteroides</i> ^b		<i>Bifidobacterium</i> ^b		<i>Lactobacillus</i> ^b	
		X ± SD	R ²	β	R ²	β	R ²	β	R ²	β	R ²	β	R ²
Flavonoids	480.97 ± 281.48	0.055	-0.182	0.158	-0.399*	0.086	-0.299	0.021	0.015	0.092	-0.108	0.129	-0.270
Anthocyanins	28.44 ± 43.16	0.050	-0.087	0.033	-0.107	0.011	-0.034	0.024	-0.052	0.084	-0.050	0.107	-0.202
Dihydrochalcones	2.95 ± 2.76	0.044	0.036	0.023	0.035	0.021	0.109	0.050	0.173	0.109	0.167	0.067	-0.006
Dihydroflavonols	3.51 ± 4.43	0.047	0.071	0.033	-0.109	0.011	-0.040	0.109	-0.304	0.083	0.041	0.071	-0.069
Flavanols	232.57 ± 189.02	0.054	0.110	0.035	-0.117	0.011	-0.036	0.024	0.050	0.082	-0.024	0.074	-0.088
Flavanones	157.07 ± 169.74	0.094	0.235	0.244	-0.559*	0.214	-0.536*	0.024	0.018	0.129	-0.256	0.157	-0.356
Flavones	4.34 ± 5.17	0.048	0.078	0.115	-0.355	0.115	-0.377	0.024	0.059	0.082	-0.027	0.141	-0.316
Flavonols	52.09 ± 42.77	0.076	-0.184	0.022	-0.021	0.012	0.050	0.035	-0.116	0.145	0.252	0.077	0.099
Phenolic acids	164.33 ± 164.47	0.090	0.218	0.040	-0.135	0.014	-0.065	0.040	0.139	0.098	0.129	0.078	-0.104
Hydroxybenzoic	17.04 ± 26.29	0.059	-0.129	0.028	-0.079	0.010	-0.016	0.021	0.016	0.085	-0.056	0.102	-0.190
Hydroxycinnamic	147.15 ± 153.64	0.107	0.255	0.039	-0.131	0.014	-0.067	0.042	0.146	0.103	0.0148	0.073	-0.080
Hydroxyphenylacetic	0.15 ± 0.16	0.069	-0.169	0.028	-0.081	0.010	-0.021	0.097	-0.283	0.084	0.043	0.067	0.021
Lignans	1.00 ± 0.38	0.048	-0.094	0.048	0.195	0.035	0.191	0.034	-0.133	0.082	0.000	0.154	0.352
Stilbenes	2.30 ± 2.84	0.046	0.063	0.033	-0.111	0.011	-0.041	0.104	-0.294	0.083	0.035	0.073	-0.080
Other polyphenols	0.41 ± 0.48	0.053	-0.110	0.034	0.113	0.014	0.067	0.068	-0.225	0.090	-0.094	0.078	0.107

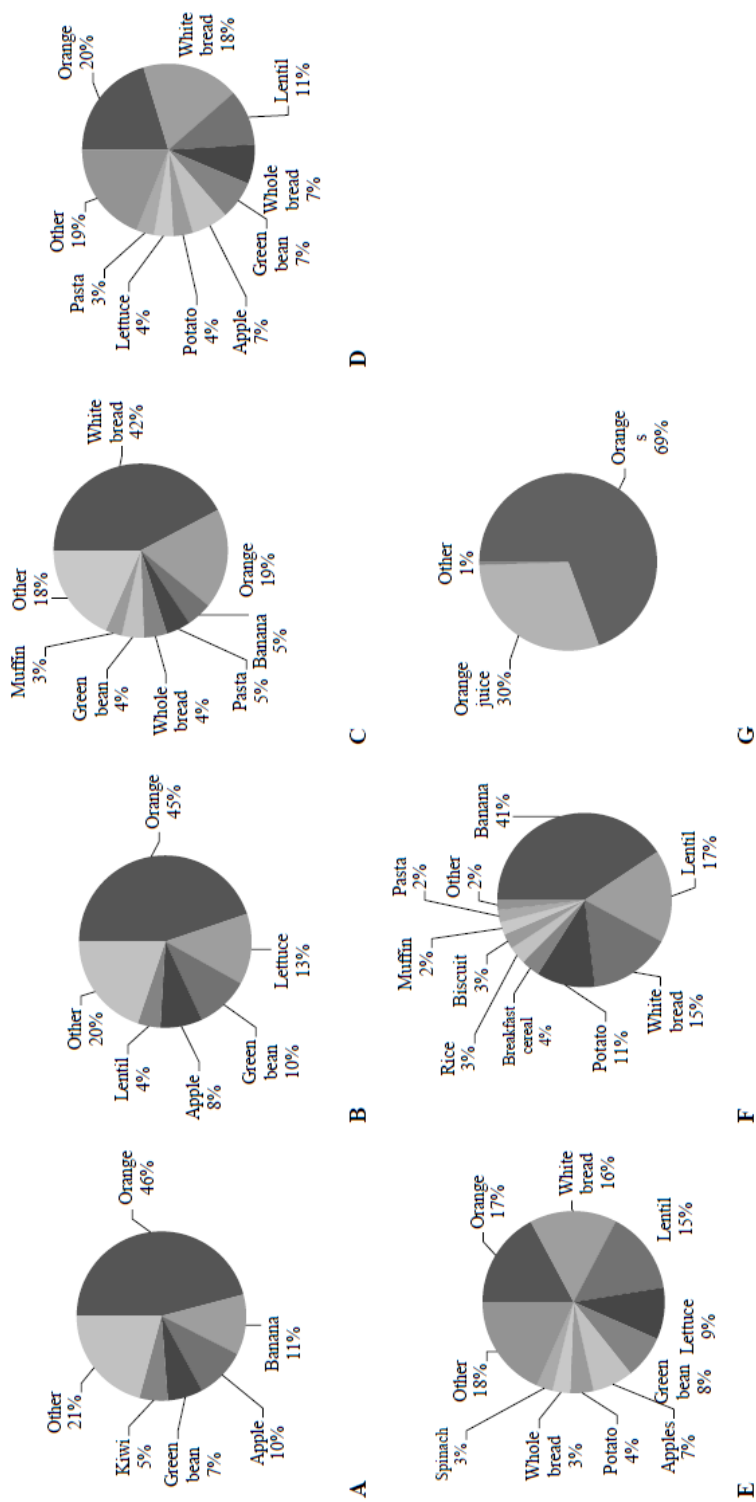
(n = 38) ^a Based on multiple regression analysis adjusted by age and energy intake. β: standardized regression coefficient.R²: coefficient of multiple determinations. * p ≤ 0,05

Table 4: Combined Effect of Fibers, Polyphenols and their Food Sources on Fecal Levels of Microbial Groups^a (log no. cells/g feces).

	<i>B. coccoides</i> ^b			<i>C. leptum</i> ^b			<i>Lactobacillus</i> ^b		
	Variables	R ²	β	Variables	R ²	β	Variables	R ²	β
Model 1									
	1			Flavanone	0.121	-0.348 *	Hemicellulose I		0.819 **
	² Resistant Starch	0.134	0.366*				Resistant Starch		0.316*
							Energy	0.520	-0.389*
Model 2									
	¹ Orange		-0.532 *	Orange	0.131	-0.362 *	White bread	0.266	0.515**
	Energy	0.244	0.389 *						
	² Pasta	0.110	0.331*						

(n = 38) ¹No results are presented for *Akkermansia* since neither resistant starch nor any of its food sources persisted in the models. ²Based on multiple stepwise regression analysis adjusted by age and energy intake. Hemicellulose I: insoluble hemicellulose; β: standardized regression coefficient; R²: coefficient of multiple determinations. **Model 1** (fibers & polyphenols): *C. coccoides*¹ (age, energy, soluble and insoluble pectin and flavanone intake) and ² (age, energy and resistant starch intake), *C. leptum* (age, energy, soluble pectin and flavanone intake), *Lactobacillus* (age, energy, soluble fiber, soluble and insoluble hemicellulose, cellulose and resistant starch intake). **Model 2** (food sources): *B. coccoides*¹ (age, energy, orange, orange juice, lentils, apple, lettuce, green bean, kiwi and banana intake) and ² (age, energy, banana, lentil, white bread, potato, breakfast cereal, biscuit, muffin and pasta intake), *C. leptum* (age, energy, orange, orange juice, kiwi, green bean, apple and banana intake), *Lactobacillus* (age, energy, orange, white bread and whole bread, lentil, lettuce, green bean, apple, potato, spinach, pasta, banana, muffin, breakfast cereal, rice, and biscuit intake). * p ≤ 0.05 ** p ≤ 0.001.

Figure 1



MANUSCRITO 2

TITLE: Polyphenols from red wine and coffee are associated with specific intestinal microorganisms in allergic subjects

AUTHORS: Adriana Cuervo ¹, Arancha Hevia ², Patricia López ³, Ana Suárez ³, Carmen Diaz ⁴, Borja Sánchez ², Abelardo Margolles ² and Sonia González ^{1*}

¹ Physiology Area, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain

² Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain

³ Immunology Area, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain

⁴ Allergology Service of Central University Hospital of Asturias, Oviedo, Asturias, Spain

* Corresponding author: Sonia González. Physiology Area, Department of Functional Biology, University of Oviedo. Facultad de Medicina. C/Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain. Tel: +34 985104209. Fax: +34985103534. Email: soniagsolares@uniovi.es.

ABSTRACT

Recent evidence has suggested the involvement of intestinal microbiota in the initiation and amplification of allergy processes. Dietary modulation of the gut microbiota has attracted much interest in recent years. While several studies have

addressed the use of dietary fibers to modify intestinal microbial populations, information about other highly correlated components, such as polyphenols, is scarce. The aim of this work was to identify the dietary components able to influence this altered microbiota in 23 subjects suffering from rhinitis and allergic asthma, and 22 age and sex-matched controls. Food intake was recorded by means of a food frequency questionnaire. Energy intake was obtained from CESNID food composition tables, dietary fibers were obtained from Marlett *et al.* Database and the Phenol-Explorer Database was used for polyphenol intake. Quantification of microbial groups was performed by Ion Torrent 16S rRNA gene-based analysis. Results showed a direct association between the intake of red wine, source of stilbenes, and the relative abundance of *Bacteroides*, and between coffee, rich in phenolic acids, and the abundance of *Clostridium*, *Lactococcus* and *Lactobacillus* genera. Despite epidemiological analyses not establishing causality, these results support the association between polyphenol rich beverages and fecal microbiota in allergic patients.

INTRODUCTION

Large amounts of data have discussed the involvement of intestinal bacteria in the initiation and amplification of inflammatory processes, allergies and autoimmune diseases [1]. During the last few years, there has been an increasing interest in the study of gut microbiota, using high throughput techniques, in order to establish associations between the gut microbes and these pathologies [2,3]. Allergy is a disorder of the immune system characterized by a hypersensitive reaction induced by certain types of antigens referred to as allergens. Lifestyle changes in western countries may be interfering in the mutualistic relationship between bacteria and host, leading to an increase in the incidences of this disease

[4]. With regard to this, recent work by our group has characterized the fecal microbiota of allergic patients, showing significant differences in the bifidobacterial population (unpublished results). Although it has been proposed that some food components, such as probiotics, prebiotics and antioxidants, are critical players in the correct maintenance of the immune system, their association with the microbiota in immunological disorders has not yet been described [5]. Apart from probiotics and prebiotics, other bioactive compounds from diet, such as polyphenols, are able to modulate the intestinal microbiota in different population groups. Evidence from animal and human studies has shown that supplementing diet with polyphenol-rich food, such as red wine [6], tea [7], cocoa [8] or blueberry [9,10], produces modifications in the intestinal bacterial populations. Despite the unclear impact of these microbial changes on health, polyphenols have shown promising results in different trials with animal models of allergy [11] and autoimmunity [12].

More studies are needed in order to increase our understanding of the relationship between dietary compounds and gut microbiota in allergic patients and, therefore, to establish some pillars for the rational design of functional foods and future dietary intervention strategies directed to improve the symptoms of these chronic patients. Given that the imbalance of intestinal bacterial populations is susceptible to being modified by shifting dietary patterns, the aim of our work was the identification of dietary components able to modify this altered microbiota and, in consequence, potentially positively influence the course of this disease.

SUBJECTS AND METHODS

Volunteers

Twenty three subjects suffering from rhinitis and allergic asthma were randomly selected according to the clinical criteria recommended by the European Community Respiratory Health Survey [13], functional criteria (spirometry and bronchial challenge test with methacholine) and immunological criteria (total IgE > 75 kU/L, determination of specific IgE to some key antigens, and positive cutaneous tests for those key antigens). Subjects diagnosed as having autoimmune diseases, IBD or other diseases known to affect the intestinal function, as well as subjects who had undergone medical treatment with oral corticoids, immunosuppressive agents, monoclonal antibodies, antibiotics or immunotherapy were not considered for this study. Twenty two age and sex matched subjects from the same population were recruited as controls.

Ethics approval for this study (reference code AGL2010-14952; grant title “Towards a better understanding of gut microbiota functionality in some immune disorders”) was obtained from the Bioethics Committee of CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) and from the Regional Ethics Committee for Clinical Research (Servicio de Salud del Principado de Asturias) in compliance with the Declaration of Helsinki. All determinations were performed with fully informed written consent from all participants involved in the study.

Nutritional assessment

Dietary intake was assessed by means of a semi-quantitative food-frequency questionnaire referring to 160 items. During a personal interview, subjects were asked item-by-item whether they usually ate each food and, if so, how much they usually ate. For this purpose, 3 different serving sizes of each cooked food were presented in pictures to the participants, so that they could choose from up to 7 serving sizes (from “less than the small one” to “more than the large one”). For some of the foods consumed, amounts were recorded in household units, by volume, or by measuring with a ruler. Special attention was paid to cooking practices, number and amount of ingredients used in each recipe, as well as questions concerning menu preparation (e.g., type of oil, type of milk used) and other relevant information for the study, such as the consumption of skin in fruit. Food intake was analyzed for energy using the nutrient Food Composition Tables developed by CESNID [14], dietary fiber (total and subtypes) from Marlett *et al.* food composition tables [15], and the polyphenol content in foods was completed using the Phenol Explorer Database [16].

Anthropometric measures

Body mass index (BMI) was calculated from the formula: weight (kg) / height (m)². Height was registered using a stadiometer with an accuracy of ± 1 mm (Año-Sayol, Barcelona, Spain). Subjects stood barefoot, in an upright position and with the head positioned in the Frankfort horizontal plane. Weight was measured on a scale with an accuracy of ± 100 g (Seca, Hamburg, Germany).

Microbiological analyses

Fecal DNA extraction, 16S rRNA amplification sequencing of 16S rRNA gene-based amplicons and the sequence-based microbiota analysis were performed according to Hevia *et al.* (submitted). The raw sequences reported in this article have been deposited in the NCBI Short Read Archive (SRA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM-SPSS version 19.0 (SPSS-Inc., Chicago). For descriptive purposes, mean values were presented on untransformed variables. Linear regression analysis was used to investigate the association between the intake of animal protein, lipids, dietary fiber (total and subtypes) and polyphenol classes with fecal microbial genera. We also introduced sex, energy intake and age as covariates. The main food sources of the dietary components previously related to microbiota were selected and placed in a multiple stepwise regression analysis to explore whether their association with microbial groups remained with independence of covariates and other related variables included in the model. The statistical parameters employed were β (standardized regression coefficient) and R^2 (coefficient of multiple determinations). The conventional probability value for significance (0.05) was used in the interpretation of results.

RESULTS

General characteristics of the sample, mean intake of energy, dietary fiber (total and subtypes) and polyphenol classes in allergy patients and controls are compared in Table 1. No significant differences were found for any of the

variables under study, with the exception of lignan intake, which was higher in the control group.

Results from linear regression analysis between the intake of dietary components and microbial genera, in patients and controls are presented in Tables 2 and 3. Positive associations were identified between the intake of total and insoluble fiber with the relative abundance of *Clostridium* (*F. Ruminococcaeae*) in allergic subjects (Table 2). Also, *Clostridium* (*F. Ruminococcaeae*), *Lactococcus* and *Lactobacillus*, were directly associated with phenolic acids, and *Bacteroides* (*F. Lachnospiraceae*) with stilbenes (Table 3). Given the high correlation between polyphenols and fibers from foods, an additional stepwise regression analysis was conducted to explore the relative importance of total and insoluble fiber and phenolic acids intake on *Clostridium*. Phenolic acid intake was found to be an independent contributor to this microbial group (data not shown).

With the aim of exploring the associations observed in allergy subjects, the main food sources of phenolic acids and stilbenes were calculated (Figure 1). Coffee, identified as one of the top contributors of phenolic acids, was found to be an independent contributor to *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Clostridium* variation. Also, red wine, accounting for 95% of the intake of stilbenes, was positively associated with the relative abundance of *Bacteroides* in feces (Table 4).

DISCUSSION

The increase of allergy prevalence that has occurred in westernized countries recent decades has been explained, in part, by the hygiene theory [17,18]. In agreement with this, we have found a different intestinal microbiota composition in allergy patients with respect to controls (unpublished results). Our results

represent a first step in broadening the knowledge of the association between diet and microbiota in allergic patients, supporting the interaction between polyphenols and microbiota, and pointing to a specificity between them, to the extent that only certain microbial groups have been associated with the intake of these compounds, and because the observed associations in allergic were not extrapolated to the controls. Though a possible explanation could be the existence of differences in the intake of these compounds, we have not found any, except for lignans which represented a low proportion of total polyphenol intake and were not associated with any microbial genera. Thus, it seems more probable that intra-group variability in microbiota composition may involve the different diet-microbiota associations observed in allergic subjects with respect to those of the control [19,20].

From all the evaluated dietary components previously associated with microbiota [21,22], phenolic acids and stilbenes were independently associated with some bacterial genera in the allergic patients. Despite the fact that the benefits of increasing the levels of *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* and *Bifidobacterium* in allergic patients are not well documented, studies using animal models have proposed that the administration of some of these bacteria is able to modulate the allergic response, by means of T cell response regulation [23]. In relation to this, it has been shown that oral administration of a mix of several *Clostridium* strains attenuated disease in a mice model of allergic diarrhea through the activation of T regulatory cells [24]. If this data is confirmed in the future, our results could have important implications for allergy disease.

Although a positive association between the intake of fiber and *Clostridium* was also detected, in accordance with scientific evidence about the interaction of this

component on microbiota modulation [25], this appeared to be linked to phenolic acid consumption, since its association disappeared when the model was controlled by these phenolic compounds. In this regard, the nutritional assessment of the whole diet, carried out in this work, may have some advantages with respect to intervention studies, since the mixture of polyphenols provided by diet, together with other dietary components contained in the polyphenol-rich foods, such as fibers, may improve the fecal environment, interacting with the behavior of some bacterial groups [26].

In spite of the low coffee intake in our sample, in comparison with other European countries (mean 60.7 ml/d vs. 270 ml/d) [27], our results pointed to a positive association between this beverage and *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Clostridium*. The effect of coffee on intestinal microbiota is not yet clear. Results from an animal model indicate that this drink could limit the growth of some bacterial groups, such as *Clostridium* and *Escherichia coli* and, at the same time, encourage others as *Bifidobacterium* [28]. This bifidogenic effect of coffee has also been found in intervention studies with humans [29], in accordance with our results. However, given the nature of this study, we are not able to analyze factors such as the variety of coffee, its degree of roasting or processing, that could have an impact on its polyphenol content [30].

In relation to red wine, it has been suggested that the intake of one of its major stilbene, resveratrol, could prevent the development of some allergies [31]. Therefore, apart from the antioxidant, anti-inflammatory and anti-allergic properties widely described for red wine phenolics [32-34], our results support a potential role for this beverage in microbiota modulation, by means of its association with *Bacteroides*, as has previously been suggested [6]. At this point,

it should be taken into account that the statistical power of our study may be limited by the relatively small sample size, and that the intake of polyphenols in the sample could be insufficient, when compared with that of intervention studies, to have an impact on other members of the intestinal microbiota.

Despite epidemiological analyses not establishing causality, these results support the association between polyphenol rich beverages, such as coffee and red wine, on fecal microbiota in allergic patients. These descriptive results will be useful for future research focused on the relationship between diet and microbiota, although more investigation is needed in order to corroborate these data before making dietary recommendations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation within the framework of the Subprogramme for Non-oriented Fundamental Research Projects. We show our greatest gratitude to all the volunteers participating in the study.

CONFLICT OF INTEREST

All authors have declared not conflict of interest and read and approved the final submitted manuscript. No portion of the manuscript has been previously published

REFERENCES

[1] Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013;11(4):227-38.

- [2] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(43):16731-6.
- [3] Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009;1(6):6ra14.
- [4] Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 2010;160(1):1-9.
- [5] Faria AM, Gomes-Santos AC, Goncalves JL, Moreira TG, Medeiros SR, Dourado LP, Cara DC. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. *Front Immunol* 2013;4:102.
- [6] Queipo-Ortuno MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, Cardona DF, Andres-Lacueva C, Tinahones FJ. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr* 2012;95(6):1323-34.
- [7] Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol* 2006;157(9):876-84.
- [8] Massot-Cladera M, Perez-Berezo T, Franch A, Castell M, Perez-Cano FJ. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys* 2012;527(2):105-12.
- [9] Guglielmetti S, Fracassetti D, Taverniti V, Del BC, Vendrame S, Klimis-Zacas D, Arioli S, Riso P, Porrini M. Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink. *J Agric Food Chem* 2013;61(34):8134-40.

- [10] Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J Agric Food Chem* 2011;59(24):12815-20.
- [11] Singh A, Holvoet S, Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2011;41(10):1346-59.
- [12] Schoenroth LJ, Hart DA, Pollard KM, Fritzler MJ. The effect of the phytoestrogen coumestrol on the NZB/W F1 murine model of systemic lupus. *J Autoimmun* 2004;23(4):323-32.
- [13] Burney PG, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1994;7(5):954-60.
- [14] Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética (CESNID). Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Barcelona: McGraw-Hill: Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona; 2008.
- [15] Marlett JA, Cheung TF. Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 1997;97(10):1139-48, 1151.
- [16] Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du CL, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)* 2010;2010:bap024.
- [17] Blaser MJ, Flakow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Microbiol* 2009;7:887-94.
- [18] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299(6710):1259-60.
- [19] Cerda B, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* 2005;53(2):227-35.

- [20] Gross G, Jacobs DM, Peters S, Possemiers S, van DJ, Vaughan EE, Van de Wiele T. In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J Agric Food Chem* 2010;58(18):10236-46.
- [21] Etxeberria U, Fernandez-Quintela A, Milagro FI, Aguirre L, Martinez JA, Portillo MP. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *J Agric Food Chem* 2013;61(40):9517-33.
- [22] Jeffery IB, O'Toole PW. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients* 2013;5(1):234-52.
- [23] Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front Microbiol* 2011;2:180.
- [24] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 2013;500(7461):232-6.
- [25] Schantz M, Erk T, Richling E. Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. *Biotechnol J* 2010;5(10):1050-9.
- [26] Sembries S, Dongowski G, Jacobasch G, Mehrlander K, Will F, Dietrich H. Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br J Nutr* 2003;90(3):607-15.
- [27] Dik VK, Bueno-de-Mesquita HB, Van Oijen MG, Siersema PD, Uiterwaal CS et al. Coffee and tea consumption, genotype based CYP1A2 and NAT2 activity, and colorectal cancer risk - results from the EPIC cohort study. *Int J Cancer* 2013.
- [28] Nakayama T, Oishi K. Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses. *FEMS Microbiol Lett* 2013;343(2):161-8.

- [29] Jaquet M, Rochat I, Moulin J, Cavin C, Bibiloni R. Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *Int J Food Microbiol* 2009;130(2):117-21.
- [30] Mills CE, Oruna-Concha MJ, Mottram DS, Gibson GR, Spencer JP. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chem* 2013;141(4):3335-40.
- [31] Okada Y, Oh-oka K, Nakamura Y, Ishimaru K, Matsuoka S, Okumura K, Ogawa H, Hisamoto M, Okuda T, Nakao A. Dietary resveratrol prevents the development of food allergy in mice. *PLoS One* 2012;7(9):e44338.
- [32] Holmes-McNary M, Baldwin AS, Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Res* 2000;60(13):3477-83.
- [33] Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy* 2000;30(4):501-8.
- [34] van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214(3):755-9.
- [35] Smith AH, Zoetendal E, Mackie RI. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb Ecol* 2005;50(2):197-205.
- [36] Viveros A, Chamorro S, Pizarro M, Arija I, Centeno C, Brenes A. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult Sci* 2011;90(3):566-78.

Table 1 General description of the studied variables in allergy patients and controls.

	Allergic (N=23)	Control (N= 22)
Age (y)	39.39 ± 11.28	39.18 ± 9.50
Male sex (%)	43.5	31.8
BMI (kg/m ²)	26.27 ± 3.94	25.00 ± 3.63
Energy (kcal /d) ^a	1995.80 ± 429.14	2187.52 ± 565.21
Total fiber (g/d) ^{a,b}	15.85 ± 6.88	17.53 ± 8.05
Soluble fiber (g/d) ^{a,b}	2.65 ± 1.24	2.62 ± 0.96
Insoluble fiber (g/d) ^{a,b}	13.21 ± 5.72	14.91 ± 7.14
Total polyphenols (mg/d) ^{a,b}	1713.75 ± 699.55	1628.98 ± 855.48
Flavonoids (mg/d) ^{a,b}	428.32 ± 259.88	383.39 ± 350.66
Phenolic acids (mg/d) ^{a,b}	333.21 ± 210.46	307.37 ± 262.16
Lignans (mg/d) ^{a,b}	0.78 ± 0.23	1.04 ± 0.50 *
Stilbenes (mg/d) ^{a,b}	1.59 ± 2.79	0.63 ± 0.77

Results are presented as mean ± SD and percentage (%).Multivariate analysis adjusted by ^a age, gender and ^b energy intake. * p ≤ 0.05

Table 2 Linear regression analysis between dietary intake of fiber (total and subtypes) and dominant microbial genera, in patients with allergy and controls.

		Total fiber	Soluble fiber	Insoluble fiber
<i>Bacteroides (F. Lachnospiraceae)</i>	A	-0.238	-0.228	-0.229
	C	0.135	0.262	0.117
<i>Bacteroides (F. Bacteroidaceae)</i>	A	-0.327	-0.276	-0.326
	C	0.020	0.029	0.018
<i>Bacteroides (F. Ruminococcaeae)</i>	A	0.269	0.198	0.275
	C	-0.439	-0.474	-0.432
<i>Bifidobacterium</i>	A	-0.022	0.006	-0.028
	C	-0.178	-0.220	-0.171
<i>Blautia</i>	A	-0.272	-0.116	-0.301
	C	-0.023	-0.055	-0.018
<i>Lactococcus</i>	A	0.099	-0.107	0.149
	C	-0.067	-0.091	-0.064
<i>Lactobacillus</i>	A	0.564	0.252	0.549
	C	-0.029	-0.039	-0.028
<i>Clostridium (F. Lachnospiraceae)</i>	A	-0.548	-0.442	-0.552
	C	0.152	0.140	0.152
<i>Clostridium (F. Clostridiaceae)</i>	A	0.123	-0.069	0.168
	C	0.111	0.031	0.122
<i>Clostridium (F. Ruminococcaeae)</i>	A	0.777*	0.524	0.809*
	C	-0.290	-0.287	-0.289
<i>Faecalibacterium</i>	A	-0.488	-0.516	-0.459
	C	-0.334	-0.377	-0.327
<i>Streptococcus</i>	A	-0.178	-0.294	-0.139
	C	-0.021	-0.063	-0.016

A = Allergy (N = 23); C = Control (N = 22). Results are expressed as (standardized regression coefficient). Units: microbial genera (%), dietary components (g/d). * $p \leq 0.05$

Table 3 Linear regression analysis between dietary intake of polyphenols and microbial genera in patients with allergy and controls.

		Flavonoids	Phenolic acids	Lignans	Stilbenes
<i>Bacteroides</i>	A	-0.037	-0.333	0.073	0.631*
(<i>F. Lachnospiraceae</i>)	C	0.093	0.047	-0.314	0.184
<i>Bacteroides</i>	A	-0.298	0.049	-0.498	0.280
(<i>F. Bacteroidaceae</i>)	C	-0.257	-0.176	0.065	-0.037
<i>Bacteroides</i>	A	-0.248	0.442	0.311	-0.046
(<i>F. Ruminococcaeae</i>)	C	-0.170	-0.306	0.117	-0.182
<i>Bifidobacterium</i>	A	-0.443	0.146	0.053	-0.023
	C	-0.300	-0.265	-0.240	-0.038
<i>Blautia</i>	A	-0.141	-0.136	-0.024	0.317
	C	0.106	-0.006	-0.166	0.202
<i>Lactococcus</i>	A	-0.031	0.635*	-0.015	-0.193
	C	-0.155	-0.159	-0.173	-0.240
<i>Lactobacillus</i>	A	0.162	0.567*	-0.250	-0.349
	C	-0.115	-0.005	-0.521	-0.098
<i>Clostridium</i>	A	0.102	-0.124	0.060	0.103
(<i>F. Lachnospiraceae</i>)	C	0.163	-0.138	-0.261	0.175
<i>Clostridium</i>	A	-0.227	-0.170	-0.428	-0.471
(<i>F. Clostridiaceae</i>)	C	0.209	-0.082	0.035	-0.019
<i>Clostridium</i>	A	0.125	0.630*	-0.150	0.024
(<i>F. Ruminococcaeae</i>)	C	-0.067	-0.090	0.109	-0.005
<i>Faecalibacterium</i>	A	0.229	0.096	0.094	0.294
	C	-0.111	-0.139	0.570	-0.082
<i>Streptococcus</i>	A	-0.211	0.289	-0.151	-0.272
	C	-0.173	0.203	-0.105	0.011

A = Allergy (N = 23); C = Control (N = 22)

Results are expressed as β (standardized regression coefficient).

Units: microbial genera (%), dietary components (mg/d).

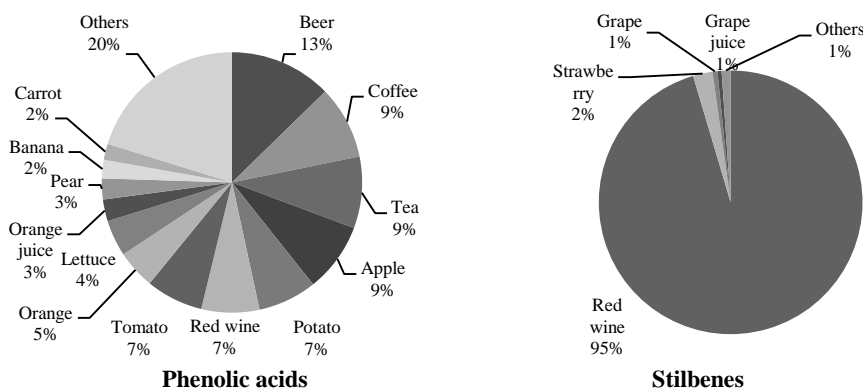
* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$.

Table 4 Multiple stepwise regression analysis for prediction of bacterial genera relative abundance by the intake of phenolic acids and stilbenes in allergic patients.

	Predictors	Intake (g/d)	R ²	β	p
<i>Bacteroides</i> (<i>F. Lachnospiraceae</i>) ^a	Red wine	45.34 ± 79.64	0.325	0.570	0.004
<i>Lactococcus</i> ^b	Coffee	60.65 ± 56.08	0.434	0.659	0.001
<i>Lactobacillus</i> ^c	Coffee		0.221	0.470	0.024
<i>Clostridium</i> (<i>F. Ruminococcaceae</i>) ^d	Coffee		0.336	0.579	0.004

(N = 23) β : standardized regression coefficient; R²: coefficient of multiple determinations. Variables included in the model: ^a age, gender, energy, red wine, strawberry, grape and grape juice intake; ^{b, c, d} age, gender, energy, beer, coffee, tea, apple, potato, red wine, tomato, orange, lettuce, orange juice, pear, banana and carrot intake. Only significant results are presented.

Figure 1 Main food sources of phenolic acids and stilbenes in allergic subjects.



MANUSCRITO 3

TITLE: Polyphenols from oranges and apples are associated with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients.

AUTHORS: Adriana Cuervo ¹, Arancha Hevia ², Patricia López ³, Ana Suárez ³, Borja Sánchez ², Abelardo Margolles ² and Sonia González ^{1*}

¹ Physiology Area, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain

² Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain

³ Immunology Area, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain

* Corresponding author: Sonia González. Physiology Area, Department of Functional Biology, University of Oviedo. Facultad de Medicina. C/Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain. Tel: +34 985104209. Fax: +34985103534. Email: soniagsolares@uniovi.es.

ABSTRACT

Our group has recently proved the existence of a gut microbial dysbiosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), resulting in differences in the ratio Bacteroidetes/Firmicutes, and supporting previous evidence involving intestinal bacteria in the initiation and amplification of inflammatory processes

and autoimmune diseases. While several studies have addressed the use of dietary fibers to modify intestinal microbial populations, information about other highly correlated components, such as polyphenols, is scarce. The aim of this work was the identification of dietary components able to influence this altered microbiota in 20 women suffering from SLE and 20 age-matched controls. Food intake was recorded by means of a food frequency questionnaire. Energy and saturated fatty acid intake was calculated from CESNID food composition tables, animal protein from USDA, dietary fibers from Marlett *et al.* database and Phenol-Explorer was used for polyphenol intake. Quantification of microbial groups was performed by Ion Torrent 16S rRNA gene-based analysis. Results showed positive associations between flavone intake and *Blautia*, flavanones and *Lactobacillus* and dihydrochalcones and *Bifidobacterium* in the SLE group. Regarding the controls, dihydroflavonols were directly associated with *Faecalibacterium*, whereas flavonol intake was inversely associated with *Bifidobacterium*. From the food sources of these polyphenols related to microbiota, orange intake was directly associated with *Lactobacillus* and apple with *Bifidobacterium* in SLE, whilst red wine was the best contributor to *Faecalibacterium* variation. The association between common foods and microbial genera belonging to Firmicutes and Actinobacteria, reported to be decreased in SLE, could be of great importance for these patients.

INTRODUCTION

Gut microbiota has been related to the modulation of the immune system and with anti-oxidant defense [1-3]. We have recently proved the existence of a gut microbial dysbiosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) (Hevia *et al.*, submitted). The observed differences in the ratio Bacteroidetes/Firmicutes

with lower levels of Actinobacteria and Firmicutes (Hevia *et al.*, submitted) in SLE subjects support previous evidence involving intestinal bacteria in the initiation and amplification of inflammatory processes and autoimmune diseases [4-6]. In this context, it has been reported that patients with metabolic syndrome fed with a low fat/high carbohydrate diet suffered an increase in *Bacteroides spp.* and *Bifidobacterium spp.* [7]. Other previous studies have positively associated levels of Firmicutes with a low-fat/high-fiber diet [8] and the increase in Firmicutes/Bacteroidetes ratio with whole grain supplementation [9]. Also, it has been described that the microbiota of people with a long-term diet rich in animal protein and saturated fat presents more *Bacteroides* [10]. Apart from this, other bioactive compounds from diet, such as polyphenols, are able to modulate the intestinal microbiome [11], and have shown promising results in models of autoimmune diseases [12]. To date, there are few studies which have focused on the interactions between polyphenol intake and microbiota: evidence from animal and human studies has shown that supplementation with polyphenol-rich food, such as red wine [13], tea [11], cocoa [14] or blueberries [15,16], modulates some intestinal bacterial populations, but the results were not conclusive. While Queipo-Ortuño *et al.* have recently published changes in Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes concentration in humans after a dietary intervention with alcoholic beverages (red wine and gin) and de-alcoholized red wine [13], animal studies have found a lower proportion of *Clostridium* and *Lactobacillus* in polyphenol-treated rats with respect to the control [17]. Moreover, the effects of cocoa flavanols remain controversial: an increase in *Lactobacillus* and *Bacteroides* has been described in humans [18], but evidence in animal studies showed a decrease of *Bacteroides*, *Clostridium* and *Staphylococcus* [14]. Thus, as this imbalance is susceptible to be modified by shifting dietary patterns, the global aim of this paper was the identification of

dietary components associated with this altered microbiota. Knowledge of the interactions between diet and microbiota in SLE subjects may be useful in the future to establish some pillars for the rational design of functional foods and dietary intervention strategies directed to improve the clinical manifestations of these chronic patients.

SUBJECTS AND METHODS

Volunteers

The study sample comprised 20 patients of SLE selected from the updated Asturian Register of Lupus [19]. All of them fulfilled at least four of the American College of Rheumatology criteria for SLE [20], were women of Caucasian origin, aged between 35-70 years and had no active disease at the time of sampling (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) score ≤ 8). Only those individuals who had not used antibiotics, glucocorticoids, immunosuppressive drugs, monoclonal antibodies, or other immunotherapies were recruited for the study. Twenty age-matched healthy women from the same population were recruited as controls.

Ethics approval for this study (reference code AGL2010-14952; grant title “Towards a better understanding of gut microbiota functionality in some immune disorders”) was obtained from the Bioethics Committee of CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) and from the Regional Ethics Committee for Clinical Research (Servicio de Salud del Principado de Asturias) in compliance with the Declaration of Helsinki. All determinations were performed with fully informed written consent from all participants involved in the study.

Nutritional assessment

Dietary intake was assessed by means of an annual semi-quantitative food-frequency questionnaire of 160 items. During a personal interview, subjects were asked item-by-item whether they usually ate each food and, if so, how much they usually ate. For this purpose, 3 different serving sizes of each cooked food were presented in pictures to the participants, so that they could choose from up to 7 serving sizes (from “less than the small one” to “more than the large one”). For some of the foods consumed, amounts were recorded in household units, by volume, or by measuring with a ruler. Special attention was paid to cooking practices, number and amount of ingredients used in each recipe, as well as questions concerning menu preparation (e.g., type of oil used, type of milk) and other relevant information for the study, such as the consumption of skin in fruit. Food intake was analysed for energy and saturated fatty acid content using the nutrient Food Composition Tables developed by CESNID [21]. Dietary fiber was completed from Marlett *et al.* Food Composition Tables [22], animal protein from USDA Database [23] and flavonoid intake from Phenol-Explorer Database [24].

Anthropometric measures

Body mass index (BMI) was calculated using the formula weight (kg) / height (m)². Weight was measured on a scale with an accuracy of ± 100 g (Seca, Hamburg, Germany). Height was registered using a stadiometer with an accuracy of ± 1 mm (Año-Sayol, Barcelona, Spain). Subjects stood barefoot, in an upright position and with the head positioned in the Frankfort horizontal plane.

Microbiological analyses

Fecal DNA extraction, 16S rRNA amplification sequencing of 16S rRNA gene-based amplicons and the sequence-based microbiota analysis were performed according to Hevia *et al.* (submitted). The raw sequences reported in this article have been deposited in the NCBI Short Read Archive (SRA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM-SPSS version 19.0 (SPSS-Inc., Chicago). Linear regression analysis was used to investigate the correlations between the intake of animal protein, saturated fatty acids, dietary fiber and flavonoids with fecal levels of the studied microorganisms. Age and energy intake were also included as covariates in the models. The main food sources of the dietary components previously related to microbiota were selected and placed in a multiple stepwise regression analysis to explore their independent effect. The statistical parameters employed were β (standardized regression coefficient) and R^2 (coefficient of multiple determinations). The conventional probability value for significance (0.05) was used in the interpretation of results.

RESULTS

General characteristics and daily intake of dietary components previously associated with microbiota are compared between SLE patients and control subjects in Table 1. Both groups were similar for the studied variables, with the exception of dihydroflavonol intake and Firmicutes/Bacteroidetes ratio, which were higher in the control group.

In order to explore the association between dietary components and fecal microbiota with independence of age and energy intake, linear regression analysis was conducted. Animal protein, saturated fatty acids and dietary fiber were not associated with microbial genera in any of the studied groups (Table 2). The significant associations found between flavonoid classes and microbiota are illustrated in Figure 1. Results showed positive associations between flavone intake and *Blautia*, flavanones and *Lactobacillus* and dihydrochalcones and *Bifidobacterium* in SLE group. Regarding the control group, dihydroflavonols were directly associated with *Faecalibacterium*, whereas flavanol and flavonol intake were inversely associated with *Bifidobacterium*. Given the high correlation between flavonoids from foods, an additional stepwise regression analysis was conducted to explore the relative importance of flavanol and flavonol intake on *Bifidobacterium*. Flavonol intake was found to be an independent contributor to this microbial group (data not shown).

To explore these associations, the main food sources of these flavonoids were calculated (Figure 2). In SLE subjects, oranges and their products were the top contributors to both flavones and flavanones while dihydrochalcones came exclusively from apple intake. In controls, dihydroflavonols were provided from red wine, and other foods such as tea, spinach and walnuts contributed to explain 45% of flavonol intake. We did not find differences in the intake of any food sources, with the exception of red wine, a greater consumption in controls (Table 3). From foods, orange and apple intake explained 38% and 44% of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* concentrations respectively, in SLE subjects; whereas red wine was positively associated with *Faecalibacterium* levels in the control.

DISCUSSION

Systemic lupus erythematosus is a multisystemic chronic inflammatory disease of autoimmune nature. Although the cause of this pathology is unknown, accumulating evidence suggests that the gut microbiota might impact both disease symptoms and progression. To date, there is no clear evidence about the impact of correcting dysbiosis in these patients, nevertheless the identification of dietary factors able to modify the microbial balance could be important for future investigations. With this aim, we proceeded to analyze the association among dietary components and microbiota.

Most previous works about the impact of diet on this disease are focused on the immunomodulatory effects of the supplementation, or restriction of some dietary components, including calorie, protein or fat intake [25-27], on the basis that the fact of having a pathological condition could implicate changes in food supply. However, the comparison of the global intake between SLE patients and controls presented in this study reveals that the nutritional intake of both groups is similar and, therefore, there is no dietary constituent significantly raised or lowered in relation to the presence of the pathology.

Despite previous evidence from intervention studies with high-fat diets suggesting that excessive fat intake leads to changes in the proportion of *Bacteroides* and *Clostridium* [28], our results do not support a relationship between fat intake and these bacterial groups in humans with well-balanced diet. Also, we did not find differences in fecal microbiota according to the intake of animal protein or fiber intake. It is possible that, the amounts of these dietary components in our sample were insufficient to impact on fecal microbiota or, as some authors have suggested, that the food combinations of a diet modify the

effect of dietary single components [29]. In this regard, it has been reported that the negative effects of high-fat diets were different when fat was administrated with orange juice vs. water or glucose solution [29], probably due to the high levels of antioxidant bioactive compounds, such as flavonoids, present in this beverage, and proposed in recent years as gut microbiota modulators [30].

Likely, the most important finding of this study is the identification of a direct association, in SLE patients, between flavanones, flavones and dihydrochalcones, coming from a regular diet, and fecal levels of *Blautia*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, together with the detection of an inverse association between flavonol intake and fecal levels of *Bifidobacterium*, and positive one for dihydroflavonols and *Faecalibacterium* in control subjects. The positive association between orange flavanones and *Lactobacillus* proportions found in this study is not in accordance with previous evidence of the antimicrobial activity of these flavonoids [31]. Nevertheless, we have limited information about the role of individual flavonoids on microbiota to be able to compare our results, taking into consideration that results from *in vitro* studies cannot be directly extrapolated to what occurs in the physiological context of the intestinal ecosystem, and intervention works often use very high doses of individual compounds, or high doses of polyphenol rich foods (tea, coffee or chocolate being the most frequent), which are not representative of what occurs in a regular diet.

It is known that the natural presence of flavonoids within foodstuffs and their interaction with other dietary components, such as fibers, may modify the level of polyphenols available to the gut microbiota [32]. In this sense, it is possible that dihydrochalcones from apples, along with dietary fiber, are degraded by

Bifidobacterium promoting its growth. This effect of apple polyphenols, previously reported in animal models and humans [33,34], should be of special interest for SLE patients given the immunomodulatory effect attributed to some strains of this bacterial genus [35], such as *B. bifidum* LMG13195, strain that promoted the induction of Treg cells, expressing chemokine receptors and favoring mucosal homeostasis [1,2].

Even though flavones were widely distributed among fruits and vegetables in the sample (oranges, lettuce, watermelon, kiwi, tomato, apple, etc.), none of their sources was identified as an independent predictor of *Blautia* proportion, so we speculate that the observed associations could be attributable to the combination of all flavone rich foods present in a whole diet, unlike flavanones and dihydrochalcones, provided almost exclusively by oranges and apples respectively. Since *Clostridium*-dependent induction of T reg cells may be required for maintaining immune homeostasis, and considering that *Blautia* belongs to *Clostridium cluster XIVa*, which promotes T reg cell accumulation, this result could also be of interest for other autoimmune diseases [36].

It is noteworthy that the associations observed in SLE patients did not appear in the controls, thus, in addition to the differences in the food sources of these compounds, it is possible that the variability in the composition of the gut microbiota between groups may involve different diet-microbiota associations [37,38], or that the subjects with a well-balanced immune system could be less susceptible to the effect of dietary components than subjects with altered immune responses. The influence of red wine on *Faecalibacterium* concentrations has not been previously described, but it is in agreement with the reported changes in the phyla Firmicutes after red wine administration [13], supporting the hypothesis

about the prebiotic effect of moderate red wine consumption [17]. On the other hand, the inverse association between flavonols and *Bifidobacterium* is in accordance with data from *in vitro* studies [39]. It is possible that the lack of association in SLE patients may be due to the low intake of red wine in this group compared to the controls (5.9 ± 8.9 vs. 35.1 ± 9.1 ml/d respectively). Since 80% of the SLE sample did not consume red wine we had no statistical power to detect any association with this beverage.

Finally, although epidemiological analyses do not establish causality, our findings support the association between polyphenols from a regular diet and fecal microbiota. The association between common foods, such as oranges and apples, with microbial genera belonging to Firmicutes and Actinobacteria, reported to be decreased in SLE, could be of great importance for these patients. Even when causality between changes in the Bacteroidetes: Firmicutes ratio and lupus progression requires further validation, these results will generate new hypotheses to test dietary strategies to correct dysbiosis in this pathology, suggesting a new therapeutic approach to autoimmunity diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation within the framework of the Subprogramme for Non-oriented Fundamental Research Projects. We show our greatest gratitude to all the volunteers participating in the study.

CONFLICT OF INTEREST

All authors have declared not conflict of interest and read and approved the final submitted manuscript. No portion of the manuscript has been previously published.

REFERENCES

- [1] Lopez P, Gonzalez-Rodriguez I, Sanchez B, Ruas-Madiedo P, Suarez A, Margolles A, Gueimonde M. Interaction of *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 with HT29 cells influences regulatory-T-cell-associated chemokine receptor expression. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(8):2850-7.
- [2] Lopez P, Gonzalez-Rodriguez I, Sanchez B, Gueimonde M, Margolles A, Suarez A. Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine* 2012;30(5):825-9.
- [3] Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 2011;12(1):5-9.
- [4] Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 2011;479(7374):538-41.
- [5] Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, von BM, McCoy KD, Macpherson AJ, Danska JS. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013;339(6123):1084-8.
- [6] Proal AD, Albert PJ, Marshall TG. The human microbiome and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25(2):234-40.
- [7] 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):216-23.

[8] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334(6052):105-8.

[9] Martinez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, Louk JA, Rose DJ, Kyureghian G, Peterson DA, Haub MD, Walter J. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J* 2013;7(2):269-80.

[10] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486(7402):222-7.

[11] Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol* 2006;157(9):876-84.

[12] Schoenroth LJ, Hart DA, Pollard KM, Fritzler MJ. The effect of the phytoestrogen coumestrol on the NZB/W F1 murine model of systemic lupus. *J Autoimmun* 2004;23(4):323-32.

[13] Queipo-Ortuno MI, Boto-Ordonez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, Cardona DF, Andres-Lacueva C, Tinahones FJ. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr* 2012;95(6):1323-34.

[14] Massot-Cladera M, Perez-Berezo T, Franch A, Castell M, Perez-Cano FJ. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys* 2012;527(2):105-12.

- [15] Guglielmetti S, Fracassetti D, Taverniti V, Del BC, Vendrame S, Klimis-Zacas D, Arioli S, Riso P, Porrini M. Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink. *J Agric Food Chem* 2013;61(34):8134-40.
- [16] Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J Agric Food Chem* 2011;59(24):12815-20.
- [17] Dolara P, Luceri C, De FC, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat Res* 2005;591(1-2):237-46.
- [18] Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr* 2011;93(1):62-72.
- [19] Lopez P, Mozo L, Gutierrez C, Suarez A. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus* 2003;12(11):860-5.
- [20] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25(11):1271-7.
- [21] Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética (CESNID). Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Barcelona: McGraw-Hill: Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona; 2008.
- [22] Marlett JA, Cheung TF. Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 1997;97(10):1139-48, 1151.

- [23] United States Department of Agriculture (USDA). Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Available at: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964> (accessed on 14 February 2012).
- [24] Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du CL, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database (Oxford) 2010;2010:bap024.
- [25] Auburn KJ, Qi M, Yan XJ, Teichberg S, Chen D, Madaio MP, Chiorazzi N. Lifespan is prolonged in autoimmune-prone (NZB/NZW) F1 mice fed a diet supplemented with indole-3-carbinol. *J Nutr* 2003;133(11):3610-3.
- [26] Lai NS, Lin RH, Lai RS, Kun UC, Leu SC. Prevention of autoantibody formation and prolonged survival in New Zealand Black/New Zealand White F1 mice with an ancient Chinese herb, *Ganoderma tsugae*. *Lupus* 2001;10(7):461-5.
- [27] Sawai C, Anderson K, Walser-Kuntz D. Effect of bisphenol A on murine immune function: modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice. *Environ Health Perspect* 2003;111(16):1883-7.
- [28] de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299(2):G440-G448.
- [29] Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, Korzeniewski K, Viswanathan P, Abuaysheh S, Mohanty P, Dandona P. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr* 2010;91(4):940-9.
- [30] Selma MV, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* 2009;57(15):6485-501.

[31] Celiz G, Audisio MC, Daz M. Antimicrobial properties of prunin, a citric flavanone glucoside, and its prunin 6''-O-lauroyl ester. *J Appl Microbiol* 2010;109(4):1450-7.

[32] Schantz M, Erk T, Richling E. Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. *Biotechnol J* 2010;5(10):1050-9.

[33] Sembries S, Dongowski G, Jacobasch G, Mehrlander K, Will F, Dietrich H. Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br J Nutr* 2003;90(3):607-15.

[34] Sembries S, Dongowski G, Mehrlander K, Will F, Dietrich H. Physiological effects of extraction juices from apple, grape, and red beet pomaces in rats. *J Agric Food Chem* 2006;54(26):10269-80.

[35] Konieczna P, Akdis CA, Quigley EM, Shanahan F, O'Mahony L. Portrait of an immunoregulatory Bifidobacterium. *Gut Microbes* 2012;3(3):261-6.

[36] Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331(6015):337-41.

[37] Cerda B, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* 2005;53(2):227-35.

[38] Gross G, Jacobs DM, Peters S, Possemiers S, van DJ, Vaughan EE, van de Wiele T. In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J Agric Food Chem* 2010;58(18):10236-46.

[39] Duda-Chodak A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol* 2012;63(5):497-503.

Table 1 Characteristics of the evaluated variables in SLE and controls.

	SLE (N=20)	Control (N= 20)
Age (y)	49.25 ± 10.71	46.95 ± 8.60
BMI (kg/m ²)	26.11 ± 5.31	25.17 ± 4.16
Energy (kcal /d) ^a	2189.65 ± 722.42	1858.53 ± 332.85
Animal protein (g/d) ^{a,b}	104.70 ± 27.60	100.85 ± 20.86
Saturated fatty acids (g/d) ^{a,b}	25.19 ± 14.09	24.66 ± 6.04
Dietary fiber (g/d) ^{a,b}	18.06 ± 10.04	20.32 ± 8.52
Total flavonoids (mg/d) ^{a,b}	400.13 ± 259.94	436.34 ± 189.70
Anthocyanins ^{a,b}	20.81 ± 30.30	29.73 ± 30.65
Dihydrochalcones ^{a,b}	2.70 ± 4.42	3.26 ± 3.58
Dihydroflavonols ^{a,b}	0.34 ± 0.80	1.96 ± 2.82 *
Flavanols ^{a,b}	298.54 ± 222.16	283.47 ± 160.21
Flavanones ^{a,b}	38.22 ± 29.44	45.31 ± 32.81
Flavones ^{a,b}	2.48 ± 2.39	3.96 ± 3.92
Flavonols ^{a,b}	38.00 ± 30.26	52.05 ± 25.55
Isoflavones ^{a,b}	5.52 ± 16.81	15.92 ± 66.13
Firmicutes/Bacteroidetes ratio	2.22 ± 1.48	6.58 ± 5.75 *

Results are presented as mean ± SD. Multivariate analysis adjusted by ^a age and ^b energy intake. * p ≤ 0.05

Table 2 Linear regression analyses for daily intake of animal protein, saturated fatty acids and fiber on fecal microbial in patients with SLE and control subjects.

		Animal protein (g/d) ^a		SFA (g/d) ^a		Dietary fiber (g/d) ^a	
		R ²	β	R ²	β	R ²	β
<i>Blautia</i> (%)	L	0.129	0.206	0.273	-0.874	0.109	0.129
	C	0.028	-0.117	0.016	0.031	0.046	-0.205
<i>Clostridium</i> (%)	L	0.271	0.431	0.170	0.363	0.140	-0.116
	C	0.116	0.343	0.007	0.026	0.007	-0.022
<i>Lactobacillus</i> (%)	L	0.041	-0.237	0.024	-0.312	0.031	0.225
	C	0.203	-0.347	0.091	-0.030	0.174	0.336
<i>Lactococcus</i> (%)	L	0.345	0.447	0.213	-0.193	0.218	0.150
	C	0.065	-0.210	0.029	-0.086	0.029	-0.085
<i>Faecalibacterium</i> (%)	L	0.063	-0.111	0.148	0.641	0.086	-0.232
	C	0.143	0.272	0.075	0.028	0.074	0.000
<i>Bacteroides</i> (%)	L	0.005	-0.026	0.017	0.232	0.118	0.439
	C	0.125	0.110	0.291	0.483	0.115	-0.045
<i>Bifidobacterium</i> (%)	L	0.121	-0.126	0.147	0.402	0.299	0.567
	C	0.323	-0.154	0.302	-0.046	0.371	-0.309

L = SLE (N = 20); C = Control (N = 20); SFA = Saturated fatty acids.

R²: coefficient of multiple determinations; β: standardized regression coefficient. ^a Derived from a linear regression analysis including age and energy intake as covariates.

Table 3 Mean intake of the selected food sources of flavonoids in SLE patients and controls.

	SLE (N=20)	Control (N= 20)
Orange (g/d)	58.43 ± 72.24	34.51 ± 42.75
Orange juice (g/d)	17.94 ± 33.69	51.51 ± 73.53
Lettuce (g/d)	50.63 ± 30.19	50.22 ± 42.66
Watermelon (g/d)	10.79 ± 19.11	7.01 ± 13.83
Kiwi (g/d)	21.19 ± 29.50	25.11 ± 62.61
Tomato (g/d)	84.06 ± 51.58	72.77 ± 48.13
Apple (g/d)	77.81 ± 81.87	58.72 ± 63.59
Lentils (g/d)	8.02 ± 5.12	9.31 ± 7.69
Celery (g/d)	0.18 ± 0.80	0.45 ± 1.51
Red wine (g/d)	6.79 ± 14.37	34.20 ± 52.34 *
White wine (g/d)	1.79 ± 7.99	8.95 ± 34.30
Tea (g/d)	51.52 ± 156.22	93.82 ± 172.59
Spinach (g/d)	3.01 ± 6.15	4.44 ± 5.76
Walnuts (g/d)	6.014 ± 11.24	7.75 ± 10.77
White beans (g/d)	6.61 ± 4.20	6.82 ± 7.13
Broccoli (g/d)	6.16 ± 10.63	7.64 ± 9.47
Asparagus (g/d)	9.66 ± 9.96	8.80 ± 14.87

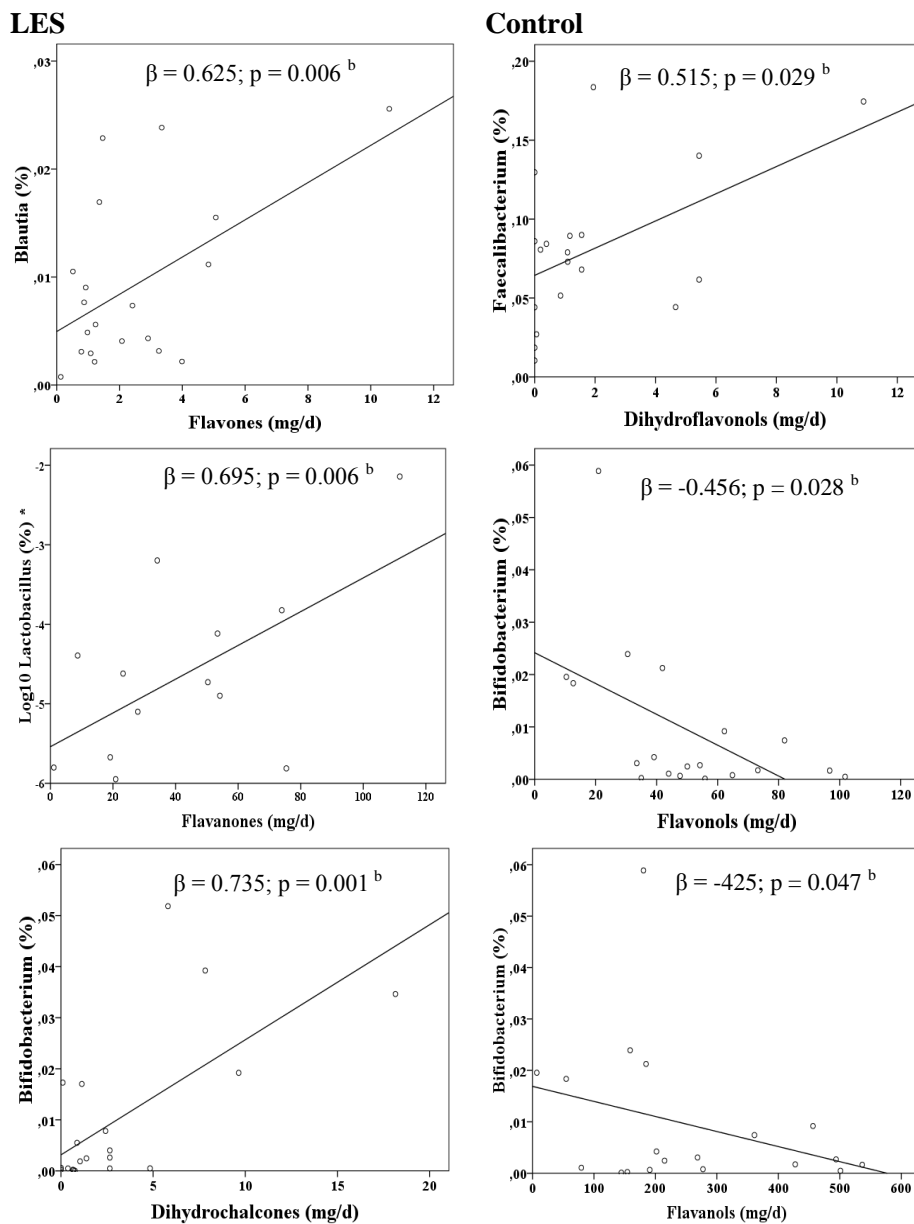
Results are presented as mean ± SD. * $p \leq 0.05$

Table 4 Results from a stepwise multiple regression analysis for prediction of relative abundance of fecal microbiota by the intake of the principal food sources of flavonoids in SLE and control subjects.

	Predictors	R ²	β	p
SLE (N=20)				
<i>Lactobacillus</i> ^a	Oranges	0.383	0.619	0.004
<i>Bifidobacterium</i> ^b	Apple	0.437	0.661	0.001
Controls (N= 20)				
<i>Faecalibacterium</i> ^c	Red wine	0.264	0.514	0.024

R²: coefficient of multiple determinations; β : standardized regression coefficient. Variables included in the model: ^a age, energy, orange and orange juice intake; ^b age, energy, and apple intake; ^c age, energy and red and white wine intake. Only significant results are presented.

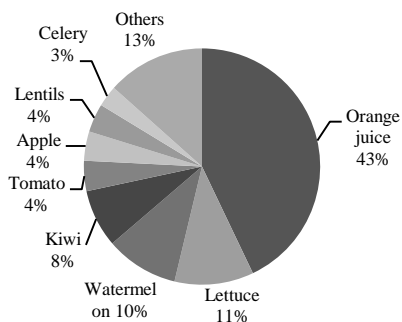
Figure 1 Linear estimation trends between the intake of some classes of flavonoids and the proportion of selected microbial genera ^a.



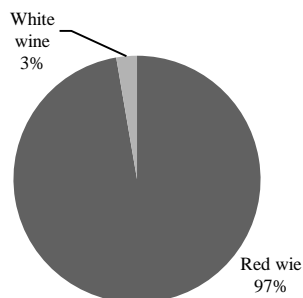
^a Only significant results are presented. ^b Results derived from linear regression analyses including age and energy intake as covariates. * Logarithmically transformed variable.

Figure 2 Principal food sources of the flavonoid classes previously associated with fecal microbiota, in the sample.

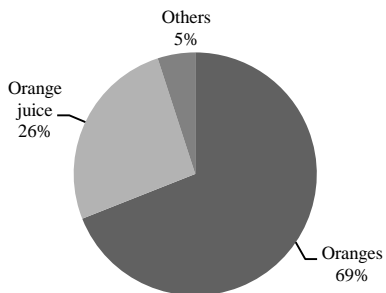
LES



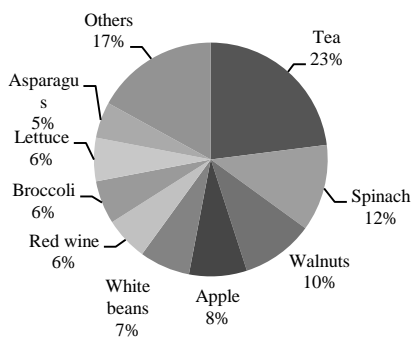
Control



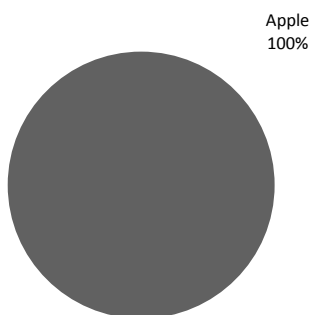
Flavones



Dihydroflavonols



Flavanones



Flavonols

Dihydrochalcones

OBJETIVO 2 (b): *Evaluar la relación entre la ingesta de alimentos, nutrientes y otros constituyentes de la dieta y la producción de ácidos grasos de cadena corta.*

La dieta, además de modular la composición de la microbiota intestinal, podría influir también sobre su actividad metabólica, siendo la fibra dietética uno de los componentes más estudiados, dada su capacidad para generar ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Esta premisa nos llevó a plantear la hipótesis de que los distintos tipos de fibras procedentes de la dieta habitual se relacionan con las concentraciones fecales de AGCC. En personas de edad avanzada, se encontró que el consumo de patata estaba asociado con mayores concentraciones fecales de acetato, propionato y butirato, identificando, además, una relación lineal entre la ingesta de manzana y las concentraciones de propionato. De los distintos tipos de fibras evaluados a partir de la dieta, se encontró una asociación independiente entre la ingesta de celulosa y las concentraciones de acetato y butirato, y entre la pectina insoluble y el propionato.

- **Publicación 3: Adriana Cuervo, Nuria Salazar, Patricia Ruas-Madiedo, Miguel Gueimonde y Sonia González.** “*Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly*”. Nutrition Research. 2013; 33 (10): 811-6.

Aportación personal: además de la participación en el reclutamiento de la muestra y la recogida e informatización de la información dietética y antropométrica, la aportación personal en este trabajo incluyó el

procesamiento y análisis estadístico de los datos, así como la colaboración en la redacción del manuscrito y la elaboración de las tablas que lo acompañan.

PUBLICACIÓN 3

NUTRITION RESEARCH 33 (2013) 811–816

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.nrjournal.com

Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly

Adriana Cuervo^a, Nuria Salazar^b, Patricia Ruas-Madiedo^b, Miguel Gueimonde^b, Sonia González^{a,*}

^a Department of Functional Biology, University of Oviedo, Facultad de Medicina, C/Julían Clavería s/n, 33006 Oviedo, Asturias, Spain

^b Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, Villaviciosa, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2012

Revised 24 May 2013

Accepted 29 May 2013

Keywords:

Short-chain fatty acids

Acetic

Propionic

Butyric

Fiber intake

Aging

ABSTRACT

It has recently been suggested that fiber exerts a considerable effect on microbiota composition and on fecal short-chain fatty acid (SCFA) production, the concentration of which in the colon is important for immune regulation and for maintaining gut and overall health. To test the hypothesis that the fiber consumed in a regular diet affects fecal SCFA concentrations in the elderly, the authors investigated the association between different types of fiber intake and fecal SCFA concentrations in 32 institutionalized elderly subjects aged between 76 and 95 years. Food intake was recorded by means of a validated food frequency questionnaire. Total, soluble (pectin and hemicellulose) and insoluble (pectin, hemicellulose, Klason lignin, and cellulose) fiber was determined using Marlett Food Composition Tables. Analysis of acetic, propionic, and butyric acid concentrations was performed using gas chromatography-mass spectrometry. Potato intake was directly associated with SCFA concentrations and apple intake with propionate concentration. Of the fibers, cellulose showed an independent association with acetate and butyrate concentrations, and insoluble pectin explained a part of the variation in propionate. In conclusion, our results provide further evidence regarding the relation between diet and SCFA concentration in the elderly. The identification of an association between the regular intake of foods such as potatoes and the production of SCFAs provides an opportunity to improve public health.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging has been defined as “the regression of physiological function accompanied by advancement of age” [1]. Age-related physiological changes in the gastrointestinal tract in addition to the atrophy of the senses of taste and smell may compromise a balanced diet, which, together with immunosenescence, inevitably affects gut microbiota composition [2]. Reduced consumption of certain foods such as vegetables or

whole grains may have an impact on the intake of fiber and other compounds that are important for maintaining proper gut function with aging. Apart from the direct effect of fiber intake on fecal bulking, enhancing gut motility, and lowering transit time [3], in recent years, fiber has been shown to exert a significant effect on the composition of the gut microbiota and its metabolites [4–7].

The main products resulting from microbial metabolism of fiber are short-chain fatty acids (SCFAs) [8,9], the concentra-

Abbreviations: MS, mass spectrometry; SCFA, short-chain fatty acid.

* Corresponding author. Tel.: +34 985104209; fax: +34 985103534.

E-mail addresses: soniagolares@uniovi.es, sonnigs@hotmail.com (S. González).

0271-5317/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2013.05.016>

tions of which in the colon are critically important for immunoregulation [10] and for maintaining gut and overall health [11–13]. Functional foods containing probiotics and prebiotics and other compounds that target the colon to enhance SCFA production have been in the forefront of research [14]. To date, most studies in this area have come from controlled intervention studies focused on modulating the composition of the gut flora with probiotics or prebiotics to maintain a well-balanced microbiota and regulate immune function [15]. Animal model studies have shown that concentrates of dietary fiber extracted from apple are effective in increasing the concentrations of propionic, butyric, and total SCFAs in feces [3], whereas supplements of soluble fiber have been associated with higher concentrations of acetic, propionic, and butyric acid [16].

To date, the effects of the different types of fiber consumed as a part of a regular diet have not been described in detail in older adults. Therefore, the primary objective of this study was to examine the association between food sources of fiber and fecal acetate, propionate, and butyrate concentration using a cross-sectional design. We hypothesized that the intake of fiber from diet may be associated with greater fecal concentrations of these SCFAs. Furthermore, we also hypothesized that soluble and insoluble fibers may behave differently in terms of the microbial production of these metabolites.

2. Methods and materials

2.1. Sample recruitment

This cross-sectional study is part of an ongoing research program into diet, immunity, and gut microbiota in elderly people. The study sample comprised 32 institutionalized volunteers (24 women and 8 men aged from 76 to 95 years). Exclusion criteria were previous diagnosis of cancer, autoimmune or digestive diseases, and consumption of probiotics/prebiotics or antibiotics during the previous month. Participants were mentally and physically able to participate in the study and gave their written informed consent. Ethical approval was obtained from the Committee on Ethical Research of the University Hospital, Oviedo.

2.2. Nutritional assessment

Dietary intake was assessed by means of a semiquantitative food frequency questionnaire, a method that has been widely used by our group in previous studies and validated for fiber intake. Trained dietitians asked about cooking practices and number and amount of ingredients used in each recipe, as well as enquiring about menu preparation (eg, type of oil used and type of milk) and other relevant information for the study on fiber intake, such as the consumption of skin in fruits. During an interview, subjects were asked item by item whether they usually ate each food, and if so, how much they usually ate. For this purpose, 3 different serving sizes of each cooked food were presented in pictures to the participants so that they could choose from up to 7 serving sizes (from “less than the small one” to “more than the large one”). For some of the foods

consumed, amounts were recorded in household units, by volume, or by measuring with a ruler. Food intake was analyzed for energy and macronutrient content using the nutrient Food Composition Tables developed by the Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética [17]. Total, soluble (pectin and hemicellulose), and insoluble (pectin, hemicellulose, Klason lignin, and cellulose) fiber was determined using Marlett Food Composition Tables, which allowed us to analyze the fiber content in a large number of foods with a high degree of detail [18].

Body mass index was calculated from the formula: height (m)/weight (kg)². Height was registered using a stadiometer with an accuracy of ±1 mm (Año-Sayol, Barcelona, Spain). Subjects stood barefoot in an upright position with their head positioned in the Frankfort horizontal plane. Weight was measured on a scale with an accuracy of ±100 g (Seca, Hamburg, Germany).

2.3. Fecal specimen collection

Fecal samples were collected right after deposition and immediately frozen to -80°C and stored until further analysis.

2.4. Chemical analyses

Analysis of SCFAs was performed using gas chromatography-mass spectrometry (MS) to measure the concentrations of acetic, propionic, and butyric acid. One gram of fecal samples was weighed, diluted 1:10 in sterile phosphate-buffered saline solution, and homogenized in a LabBlender 400 stomacher (Seward Medical, London, UK) at full speed for 4 minutes. Supernatants were then obtained by centrifugation (10 000g, 30 minutes, 4°C), filtered through 0.2-µm filters, mixed with 1/10 of ethyl butyric (2 mg/mL) as an internal standard, and stored at -80°C until analysis. A gas chromatograph 6890N (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA, USA) connected to an MS 5973N detector (Agilent) was used to quantify the SCFAs. Data were collected using Enhanced ChemStation G1701DA software (Agilent). Samples (1 µL) were directly injected into the gas chromatograph equipped with an HP-Innowax capillary column (60-m length by 0.25-mm internal diameter, with a 0.25-µm film thickness; Agilent) using He as gas carrier and a constant flow rate of 1.5 mL/min. The temperature of the injector was kept at 220°C, and the split ratio was 50:1. Chromatographic conditions were as follows: initial oven temperature of 120°C, 5°C/min up to 180°C, 1 minute at 180°C, and a ramp of 20°C/min up to 220°C to clean the column. The column was directly connected to the MS detector, and the electron impact energy was set at 70 eV. The data collected were in the range of 25 to 250 atomic mass units (at 3.25 scans/s). Short-chain fatty acids were identified by comparison of their mass spectra with those held in the HP-Wiley 138 library (Agilent) and by comparison of their retention times with those of the corresponding standards (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The peaks were quantified as the relative abundance of the total ionic count with respect to the internal standard. The concentration (in millimolar) of each SCFA was calculated using the linear regression equations ($R^2 \geq 0.99$) from the corresponding standard curves obtained with 6 different concentrations.

2.5. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using IBM SPSS version 19.0 (IBM SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Goodness of fit to the normal distribution was analyzed by means of the Kolmogorov-Smirnov test. For descriptive purposes, mean values were presented on untransformed variables. Data were presented as means \pm SD, percentiles P_5 to P_{95} , and percentages. The foods that explain 80% of fiber intake were selected to analyze their association with the concentration of the studied fatty acids. The contribution of each food to total fiber intake was calculated as a percentage. Multiple linear regression analysis was used to investigate the correlations between the different types of fiber and their main food sources in the sample and fecal acetate, propionate, and butyrate concentrations. We also introduced age and energy intake as covariates because they were positively correlated with SCFA concentrations. The statistical parameters used were β (standardized regression coefficient) and R^2 (coefficient of multiple determinations). The fibers and foods significantly associated with SCFAs were analyzed by means of a linear stepwise regression analysis to explore their independent effect on acetate, propionate, and butyrate concentrations, together with age and energy intake. Considering the SD of the fecal SCFA concentrations of this study and the SD of the regression errors, we could reject the hypothesis with an estimated probability between .88 and .99 and a type I error probability of .05 for all models in which the slope of the line is above 0.40 [obtained from Power and Sample Size Program 3.0 (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA), 2009]. The conventional probability value for significance (.05) was used in the interpretation of results.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

Dietary macronutrient, fiber intake, and fecal SCFA concentrations in the sample are shown in Table 1. Of the 11.6 g/d of fiber consumed by the sample, 82% was insoluble. Hemicellulose was the most consumed soluble fiber, whereas insoluble fiber came from cellulose, hemicellulose, pectin, and Klason lignin, in that order. As regards fecal SCFA concentrations, acetate was found at the highest concentration, followed by butyrate and propionate.

3.2. Food sources of fiber and fiber intake and SCFAs

The mean daily consumption of the foods that contribute to approximately 80% of fiber intake in the sample, together with their association with fecal acetate, propionate, and butyrate concentrations, is shown in Table 2. Although both oranges and white bread are foods with relatively low fiber content, they were identified within the top 3 contributors to fiber intake in the sample, reflecting their high intake. Despite their low average daily intake, white beans constituted the second source of fiber. Of the assessed foods, potato intake was directly associated with fecal concentrations of the 3 fatty acids under study. Apples also predicted around 30% of the variations in acetate and propionate,

Table 1 – Dietary macronutrient, fiber intake, and fecal SCFA concentrations in the samples

	Means \pm SD	P_5 - P_{95}
Energy (kcal/d)	1722.9 \pm 391.8	1207.1-2607.0
Carbohydrates (g/d)	174.9 \pm 42.5	120.3-267.0
Total fiber (g/d)	11.6 \pm 4.7	3.8-21.5
Soluble fiber (g/d)	2.07 \pm 0.87	0.72-4.07
Hemicellulose	1.39 \pm 0.58	0.48-2.83
Pectin	0.61 \pm 0.35	0.13-1.38
Insoluble fiber (g/d)	9.53 \pm 3.89	3.10-17.45
Cellulose	3.99 \pm 1.48	1.23-6.99
Hemicellulose	3.04 \pm 1.24	1.06-6.02
Pectin	1.26 \pm 0.70	0.26-2.8
Klason lignin	1.19 \pm 0.72	0.32-2.83
Fecal SCFAs		
Concentration (mg/g)		
Acetate	1.26 \pm 0.81	0.44-3.45
Propionate	0.60 \pm 0.46	0.15-1.73
Butyrate	0.62 \pm 0.60	0.13-2.48
Molar proportions (%)		
Acetate	60.57 \pm 6.36	48.64-70.83
Propionate	21.52 \pm 3.94	15.97-28.83
Butyrate	17.91 \pm 5.10	10.12-27.35

n = 32.

whereas bananas were inversely associated with these fecal SCFAs. Furthermore, white bread intake was directly associated with fecal acetate concentrations.

Our data revealed a positive association between all types of fibers and fecal acetate and propionate concentrations. However, only insoluble fibers (particularly cellulose) were associated with butyrate concentrations (Table 3). An additional stepwise regression analysis was conducted to explore the relative importance of each food fiber in SCFA concentrations (Table 4). Given that foodstuffs and fibers are highly correlated and to avoid findings being explained by another highly correlated variable, all foods and all fibers significantly associated with SCFA concentrations were placed in the model at the same time, together with age and energy intake. Of all the foods, potatoes explained a sizeable proportion of acetic, propionic, and butyric variation, and apples were directly associated with acetate and propionate concentrations (model 1). Of all the fibers included in model 2, cellulose showed an independent association with acetate and butyrate concentrations, whereas insoluble pectin accounted for 38.6% of the variation in propionate. Furthermore, the individual associations for cellulose, pectin, and potato with fecal SCFAs persisted when these variables were placed together in the same model (model 3).

4. Discussion

The study of interactions between diet and fecal SCFA concentrations is currently of major interest in nutrition research. Our data reveal that fibers consumed in regular diets are significant contributors to SCFA concentrations. Furthermore, the identification of an apparently independent association between potatoes and cellulose and fecal acetate and butyrate concentrations and potatoes, apples and insoluble pectin intake with propionate could constitute the most novel findings of this study.

Table 2 – Daily intake in the sample of the main food sources of fiber and their association with fecal acetate, propionate, and butyrate concentrations

Food ^a	Intake (g/d) ^b	Fiber contribution (%) ^c	Acetate (mg/g) ^d			Propionate (mg/g) ^d			Butyrate (mg/g) ^d		
			R ²	β	P	R ²	β	P	R ²	β	P
White bread	78.5 ± 57.9	20.8	0.262	0.361	.048	0.227	0.271	.140	0.303	0.202	.244
White beans	8.9 ± 2.5	17.7	0.180	0.183	.312	0.165	0.029	.871	0.302	0.191	.253
Oranges	63.5 ± 102.7	10.5	0.236	0.304	.086	0.268	0.334	.055	0.303	0.194	.244
Green beans	35.9 ± 23.7	7.1	0.254	-0.339	.057	0.204	-0.209	.246	0.297	-0.178	.293
Potatoes	49.6 ± 25.7	6.3	0.286	0.374	.028	0.295	0.367	.030	0.484	0.470	.002
Apple	53.4 ± 70.0	5.9	0.309	0.400	.017	0.319	0.394	.017	0.309	0.202	.210
Cauliflower	27.9 ± 33.6	5.4	0.155	0.075	.672	0.194	0.174	.317	0.295	0.165	.310
Bananas	30.0 ± 24.4	3.9	0.299	-0.408	.021	0.301	-0.391	.026	0.294	-0.170	.320

n = 32; β, standardized regression coefficient; R², coefficient of multiple determinations.

^a The selected foods account for approximately 80% of total fiber intake.

^b Data are shown as means ± SD.

^c Percentage of contribution of total fiber intake.

^d Based on multiple regression analysis adjusted for age and energy intake.

4.1. Fiber intake and SCFA concentrations in the sample

In our study sample, the intake of fiber was low in comparison with the recommended value of 10 to 13 g of fiber/1000 kcal, as is commonplace in developed countries [19]. Because the fiber intake of more than 88% of the elderly falls below this recommendation, results from studies of supplementation with supraphysiologic doses cannot be extrapolated to what occurs in this context.

As some authors have reported, it is possible that subjects with low SCFA concentrations have a greater response to fiber intake than do those with higher baseline levels [20]. In this regard, elderly subjects with lower SCFA concentrations than adults (unpublished findings) may constitute a highly sensitive population to the effects of diet modification.

4.2. Association between foods and fiber intake with fecal SCFA concentrations

Recent studies suggest that many of the health effects attributable to a particular fiber may be caused by its interaction with other components of the same food because foods in a normal diet usually contain more than 1 type of fiber [21]. For this reason, research should focus on diet, given

that some of the effects attributed to fiber are lost when it is extracted from food. As in other studies reported in the Mediterranean population, the major food sources of fiber in the sample were cereals, fruits, legumes, vegetables, and potatoes and other roots [21,22]. These food groups have been associated in epidemiological studies with a protective effect against gastrointestinal disorders, cardiovascular disease, and colon cancer [23]. Therefore, SCFAs may possibly be involved in the mechanisms via which they exert these actions [24-26]. In terms of food consumption, the intake of potatoes contributed to fecal acetic, propionic, and butyric concentrations in agreement with previous *in vitro* models [27]. To the best of our knowledge, this is the first study to describe the impact of potatoes and cellulose on SCFAs in an apparently healthy elderly population. For this reason, we were unable to compare our data with other studies in human populations.

Given that potatoes simultaneously provide cellulose, hemicellulose, and pectin, we speculated that cellulose explained a part of the effect attributed to potatoes on fecal SCFA concentrations. Although cellulose is low in fermentable fiber, the high amount consumed in our sample in comparison with other fibers (accounting for around 34% of total fiber intake) could possibly underlie the observed association with fecal SCFA concentrations. Cellulose intake can dilute

Table 3 – Association between the intake of dietary fibers and fecal acetate, propionate, and butyrate concentrations

	Acetate (mg/g) ^a			Propionate (mg/g) ^a			Butyrate (mg/g) ^a		
	R ²	β	P	R ²	β	P	R ²	β	P
Total fiber (g/d)	0.383	0.557	.003	0.385	0.543	.004	0.356	0.343	.060
Soluble fiber (g/d)	0.316	0.522	.014	0.378	0.592	.004	0.323	0.302	.141
Hemicellulose	0.279	0.508	.033	0.370	0.640	.005	0.323	0.329	.114
Pectin	0.334	0.460	.009	0.363	0.477	.006	0.323	0.250	.144
Insoluble fiber (g/d)	0.365	0.554	.005	0.386	0.562	.004	0.364	0.369	.049
Cellulose	0.385	0.599	.003	0.388	0.584	.003	0.380	0.414	.032
Hemicellulose	0.300	0.477	.020	0.326	0.494	.015	0.333	0.312	.110
Pectin	0.370	0.507	.004	0.422	0.548	.001	0.348	0.305	.075
Klason lignin	0.273	0.394	.037	0.280	0.382	.042	0.333	0.285	.110

n =32; β, standardized regression coefficient; R², coefficient of multiple determinations.

^a Based on multiple regression analysis adjusted for age and energy intake.

Table 4 – Combined effect of fibers and food fiber sources on fecal acetate, propionate, and butyrate concentrations

	Acetate (mg/g) ^a				Propionate (mg/g) ^a				Butyrate (mg/g) ^a			
	Variables	R ²	β	P	Variables	R ²	β	P	Variables	R ²	β	P
Model 1	Apples		0.401	.009	Potatoes		0.405	.013	Potatoes		0.470	.002
	Potatoes		0.394	.010	Apples	0.328	0.404	.013	Energy		0.340	.020
	Age	0.427	-0.323	.032					Age	0.484	-0.311	.030
Model 2	Cellulose	0.345	0.587	.000	Pectin I	0.386	0.621	.000	Cellulose	0.326	0.571	.001
Model 3	Cellulose		0.535	.001	Pectin I		0.548	.000	Cellulose		0.495	.001
	Potatoes	0.429	0.295	.048	Potatoes		0.399	.002	Potatoes	0.502	0.427	.003
				Apples	0.607	0.258	.045					

n = 32; pectin I, insoluble pectin; β, standardized regression coefficient; R², coefficient of multiple determinations. Only statistically significant results are shown.

Model 1 (foods): acetate (white bread, potatoes, apples, bananas and energy intake and age), propionate (potatoes, apples, bananas and energy intake and age) and butyrate (potatoes and energy intake and age). Model 2 (fibers): acetate and propionate (soluble and insoluble hemicellulose, soluble and insoluble pectin, cellulose, Klason lignin, and energy intake and age) and butyrate (cellulose and energy intake and age). Model 3 (combined effect): acetate (age, cellulose, apples, and potatoes intake), propionate (pectin I, apples, and potatoes intake), and butyrate (age, cellulose, potatoes, and energy intake).

^a Based on stepwise regression analysis between the fibers or/and foods significantly associated with SCFA concentrations.

nutrients and modify their digestibility, thus explaining the higher concentration of total SCFAs observed in the sample [28]. Some data reported in the literature, from supplementation trials in pigs, confirm the effect of this carbohydrate on SCFAs [29]. On the other hand, potatoes had an independent effect on SCFA concentrations that may be caused by other factors, including resistant starch. However, determining the amount of this compound originating from food is difficult because it depends on several factors related to food structure, processing, and consumer variability that are not well standardized [30].

Furthermore, the individual association observed between apples and fecal propionate concentrations in this study could be mediated by their pectin content. Previous studies on this topic confirmed that apple pectin evades digestion by intestinal enzymes and passes directly into the colon where it is metabolized by *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, and *Lactobacillus*, subsequently producing SCFAs [31]. Nevertheless, several reasons could explain the modest association observed in our study. First, the low fiber content in apples (1.88 g/100 g) is not comparable with the amounts administered in supplementation studies. Second, most of our elderly sample consumed peeled apples, thereby reducing the intake of insoluble fiber. Finally, it may be that the high correlation between the different sources of food fiber modified the observation of an individual effect for most foods.

The study is limited by the sample size because of the nature of the subjects. This low sample size would somewhat hamper our ability to detect significant associations by reducing the power of the statistical test. In addition, because the participants resided in institutions, our findings may not be generalizable to all elderly populations. Human experimentation is limited by the logistics problems associated with carrying out direct measurements. Fecal measurements comprise only 5% to 10% of SCFA production that is not absorbed in the colon [26].

Although epidemiological analyses do not establish causality, our findings support the hypothesis we put forward regarding the association between food fiber sources from a regular diet and fecal SCFA concentrations. Contrary to what

was expected, potato intake and insoluble fibers (cellulose and pectin) were the best independent predictors of SCFA concentrations in this sample.

Acknowledgment

This research was funded by the company Biopolis S.L. under the SENIFOOD e-cenit project from the Spanish Ministry of Science and Education. We are most grateful to all the volunteers who participated in the study.

REFERENCES

- Imahori K. How I understand aging. *Nutr Rev* 1992;50(12):351–2.
- Ervin RB. Healthy Eating Index scores among adults, 60 years of age and over, by sociodemographic and health characteristics: United States, 1999–2002. *Adv Data* 2008;395:1–16.
- Sembries S, Dongowski G, Jacobasch G, Mehrlander K, Will F, Dietrich H. Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br J Nutr* 2003;90(3):607–15.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012;488(7410):178–84.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(33):14691–6.
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JL. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009;1(6):6ra14.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334(6052):105–8.
- Macfarlane GT, Gibson GR. Microbiological aspects of short chain fatty acids production in the large bowel. In: Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T, editors. *Physiological and Clinical Aspects of Short Chain Fatty Acid Metabolism*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 87–105.

- [9] Schwiertz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18(1):190-5.
- [10] Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 2011;12(1):5-9.
- [11] Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469(7331):543-7.
- [12] Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 2009;58(7):1509-17.
- [13] Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 2009;139(9):1619-25.
- [14] Hijova E, Chmelarova A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy* 2007;108(8):354-8.
- [15] Martin FP, Wang Y, Sprenger N, Yap IK, Lundstedt T, Lek P, et al. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol* 2008;4:157.
- [16] Guerin-Deremaux L, Ringard F, Desailly F, Wils D. Effects of a soluble dietary fibre NUTRIOSE(R) on colonic fermentation and excretion rates in rats. *Nutr Res Pract* 2010;4(6):470-6.
- [17] Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética (CESNID). *Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España*. Barcelona: McGraw-Hill: Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona; 2008.
- [18] Marlett JA, Cheung TF. Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 1997;97(10):1139-48, 1151.
- [19] Pilch SM. *Physiological effects and health consequences of dietary fiber*. Bethesda, MD: Life Sciences Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology; 1987.
- [20] McOrist AL, Miller RB, Bird AR, Keogh JB, Noakes M, Topping DL, et al. Fecal butyrate levels vary widely among individuals but are usually increased by a diet high in resistant starch. *J Nutr* 2011;141(5):883-9.
- [21] Taberero M, Venema K, Maathuis AJ, Saura-Calixto FD. Metabolite production during in vitro colonic fermentation of dietary fiber: analysis and comparison of two European diets. *J Agric Food Chem* 2011;59(16):8968-75.
- [22] Taberero M, Serrano J, Saura-Calixto F. Dietary fiber intake in two European diets with high (Copenhagen, Denmark) and low (Murcia, Spain) colorectal cancer incidence. *J Agric Food Chem* 2007;55(23):9443-9.
- [23] Pereira MA, Pina JJ, Jacobs DR, Marquart L, Keenan JM. Whole grains, cereal fiber and chronic diseases: epidemiologic evidence. In: Spiller GA, editor. *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001. p. 461-79.
- [24] Brouns F, Kettlitz B, Arrigoni E. Resistant starch and the "butyrate revolution". *Trends Food Sci Technol* 2002;13(251):261.
- [25] Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 1991;70(6):443-59.
- [26] Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001;81(3):1031-64.
- [27] Mallillin AC, Trinidad TP, Raterta R, Dagbay K, Loyola AS. Dietary fibre and fermentability characteristics of root crops and legumes. *Br J Nutr* 2008;100(3):485-8.
- [28] Kienzle E, Dobenecker B, Eber S. Effect of cellulose on the digestibility of high starch versus high fat diets in dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2001;85(5-6):174-85.
- [29] Sutton AL, Kephart KB, Versteegen MW, Canh TT, Hobbs PJ. Potential for reduction of odorous compounds in swine manure through diet modification. *J Anim Sci* 1999;77(2):430-9.
- [30] Roberts J, Jones GP, Rutsihauser IHE, Birkett A, Gibbons C. Resistant starch in the Australian diet. *Nutr Diet* 2004;61(2):98-104.
- [31] Shinohara K, Ohashi Y, Kawasumi K, Terada A, Fujisawa T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* 2010;16:510-5.

OBJETIVO 3: *Evaluar el impacto de la dieta sobre marcadores de estrés oxidativo y parámetros inmunológicos.*

Los resultados de este trabajo apoyan el papel antioxidante atribuido al vino tinto, dados los menores niveles de MDA encontrados en los adultos de mediana edad con un consumo regular de esta bebida, y sugieren la relación de este alimento rico en polifenoles con la microbiota intestinal, ya que estos sujetos mostraron una composición bacteriana distinta a la de los no consumidores de vino tinto. La ausencia de consumo de esta fuente de polifenoles en los sujetos de edad avanzada imposibilitó el estudio de esta asociación en este grupo de edad.

Respecto a la relación entre la dieta y los parámetros inmunológicos, se encontró que el consumo de AGM en personas de edad avanzada estaba asociado con niveles más elevados de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-12, poniendo de manifiesto que estos ácidos grasos, más allá de ser inmunológicamente neutros, podrían exacerbar el estado inflamatorio en edades avanzadas. Por el contrario, la ingesta de AGP y vitamina C se asoció negativamente con los niveles de estos mediadores de inflamación, de acuerdo con las evidencias previas que sugieren su papel antiinflamatorio. Asimismo, la vitamina C se relacionó con una mayor actividad citotóxica de las células NK, lo que podría ser relevante para la protección frente a la infección de este colectivo especialmente vulnerable.

- **Publicación 4:** **Adriana Cuervo**, Clara G. de los Reyes-Gavilán, Patricia Ruas-Madiedo, Patricia López, Ana Suárez, Miguel Gueimonde y Sonia González. *“Red wine consumption is associated with fecal microbiota*

and malondialdehyde in a human population". Journal of the American College of Nutrition, aceptado para su publicación.

Aportación personal: la contribución personal al trabajo incluyó la recogida de la información dietética y antropométrica y la determinación de los marcadores del estado oxidante-antioxidante, así como la posterior informatización, procesamiento y análisis estadístico de los datos, junto con la colaboración en la redacción del trabajo y la presentación de los resultados.

- **Publicación 5:** Sonia González, Patricia López, Abelardo Margolles, Ana Suárez, Ángeles M. Patterson, **Adriana Cuervo**, Clara G. de los Reyes-Gavilán y Miguel Gueimonde. "*Fatty acids intake and immune parameters in the elderly*". Nutrición Hospitalaria. 2013; 28 (2): 474-478.

Aportación personal: además de la recogida de la información dietética de la muestra y la informatización, procesamiento y análisis estadístico de los datos, la aportación personal incluyó la colaboración en la elaboración de las tablas que presentan los resultados obtenidos.

- **Tablas adicionales.**
 - Adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada.

PUBLICACIÓN 4

Desde: jcunningham@umassp.edu

Enviado: 12 de marzo de 2014 16:08

Para: soniagsolares@uniovi.es

Asunto: Journal of the American College of Nutrition - Decision on Manuscript ID UACN-2013-0063.R1

12-Mar-2014

Dear Dr González:

Ref: Red wine consumption is associated with fecal microbiota and malondialdehyde in a human population.

Our reviewers have now considered your paper and have recommended publication in Journal of the American College of Nutrition. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked through the publisher's tracking system and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Journal of the American College of Nutrition and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,

Dr Cunningham

Editor in Chief, Journal of the American College of Nutrition

jcunningham@umassp.edu

TITLE: Red wine consumption is associated with fecal microbiota and malondialdehyde in a human population.

AUTHORS: Adriana Cuervo, BB¹, Clara G. de los Reyes-Gavilán, PhD², Patricia Ruas-Madiedo PhD², Patricia Lopez PhD¹, Ana Suarez PhD¹, Miguel Gueimonde PhD² and Sonia González PhD¹.

¹ Department of Functional Biology, University of Oviedo. Facultad de Medicina, C/Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain.

² Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain.

* Corresponding author: Sonia González. Department of Functional Biology, University of Oviedo. Facultad de Medicina. C/Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain. Tel: +34 985104209. Fax: +34985103534. Email: soniagsolares@uniovi.es

RUNNING TITLE: Red wine intake, MDA and fecal microbiota.

KEYWORDS: red wine, fecal microbiota, oxidative stress, antioxidants.

ABSTRACT

Objectives: Red wine intake has been associated with a lower risk of cardiovascular disease, its polyphenol content being the primary cause of antioxidant and anti-inflammatory properties attributed to this beverage. However, the way in which these activities are exerted is not yet clear, although

some authors have proposed that intestinal microbiota could be implicated.

Methods: The association between red wine intake, inflammation and oxidative stress parameters and fecal microbial populations has been explored in 38 adult volunteers. Food intake was recorded by means of an annual food frequency questionnaire (FFQ). Energy, cholesterol and ethanol intake were analyzed using the nutrient Food Composition Tables developed by CESNID and polyphenol intake was obtained from the Phenol-Explorer Database. Fecal levels of *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia coccooides* group, *Clostridium leptum* group, *Lactobacillus* group and *Faecalibacterium prausnitzii* were determined by quantitative PCR. Serum concentrations of C-reactive protein (CRP), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAC), cholesterol, triglycerides and glucose were analyzed by standard methods.

Results: Subjects with regular consumption of red wine (mean = 100 ml/day) had lower serum concentrations of MDA and lower fecal levels of *B. coccooides*, *C. leptum*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. A positive association between MDA levels and *B. coccooides* and *Lactobacillus* was also found. **Conclusion:** Regular consumption of red wine appears to be associated with a reduced serum lipoperoxidation in which the intestinal microbiota may be involved.

INTRODUCTION

In the last few decades, several studies have suggested that a moderate consumption of red wine, which is characteristic of some dietary patterns such as the Mediterranean one, is an important factor in the prevention of several pathologies related to oxidative stress [1]. Besides its alcohol content, the moderate intake of which has been related to a positive effect on health [2], red wine provides other components with additional benefits beyond those of alcohol

alone [3,4]. Red wine is a natural food source of antioxidants, among which, are phenolic compounds, especially flavonoids, lignans and stilbenes, contained in the skins and seeds of red grapes [5]. Apart from the effects that these phenolic compounds exert on the organoleptic properties of this alcoholic beverage, some authors have proposed their antioxidant capacity as the main reason for the beneficial health effects ascribed to the moderate consumption of red wine [6,7]. In this way, Estruch *et al.* found lower levels of plasma biomarkers of oxidative stress in healthy men after the consumption of red wine, compared with those consuming gin [8]. Other authors did not only find lower levels of oxidative stress with the intake of this beverage, but also higher levels in antioxidant defense [8,9]. Nevertheless, the way in which red wine exerts its antioxidant actions is not clear. Evidence from animal and human studies suggests that supplementation with polyphenol-rich foods, such as red wine could also differentially influence the intestinal bacterial populations, which have been reported to be responsible of the transformation of these compounds into other with a higher bioavailability and bioactivity [10]. In this context, the aim of this work is to bear out the association between the regular consumption of red wine and some biomarkers of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation, as well as to analyze the existence of differences in the intestinal microbiota according to the consumption of this beverage.

MATERIALS AND METHODS

Participants

The study sample involved 38 healthy adults (27 females, 11 males; aged from 55 to 67 years old). Exclusion criteria were: previous diagnosis of cancer, autoimmune or digestive diseases and consumption of vitamin or mineral

supplements, probiotics/prebiotics or antibiotics, during the previous month. Ethical approval was obtained from the Regional Ethical Committee of Asturias and an informed written consent was obtained from each volunteer.

Nutritional Assessment

Dietary intake was assessed by means of an annual semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ), detailing 160 items. Trained dieticians asked about cooking practices, number and quantity of ingredients used in each recipe (e.g., type of oil or milk used) and other information relevant to the study, such as the consumption of skin in fruits. During an interview, subjects were asked item-by-item whether they usually ate each food and, if so, how much they usually ate. For this purpose, 3 different serving sizes of each cooked food were presented in pictures to the participants so that they could choose from up to 7 serving sizes (from “less than the small one” to “more than the large one”). For some of the foods consumed, amounts were recorded in household units, by volume, or by measuring with a ruler. To record the consumption of alcoholic beverages, each participant was asked if they consumed them regularly, and if so, they were asked about the type and amount, for which household measures, such as a glass, a bottle, etc., were used. Methodological issues concerning dietary assessment have been detailed elsewhere [11]. Food intake was analyzed for energy, cholesterol and ethanol content by using the nutrient Food Composition Tables developed by CESNID [12]. Polyphenol content was obtained from Phenol-Explorer Database [13].

Height was registered by using a stadiometer with an accuracy of ± 1 mm (Año-Sayol, Barcelona, Spain). Subjects were barefoot, in an upright position and with the head positioned in the Frankfort horizontal plane. Weight was measured on a

scale with an accuracy of ± 100 g (Seca, Hamburg, Germany). Body mass index (BMI) was calculated from the formula $\text{weight (kg) / height (m)}^2$.

Microbiological and Biochemical Analyses

Each volunteer was asked to provide a fecal sample and a blood sample directly after the nutritional assessment period. Blood samples were drawn after a 12-hour fast and subsequently centrifuged and divided in aliquots. These biological samples were immediately frozen at -80 °C and stored until further analyses.

1 g of fecal sample was used for DNA extraction with the QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the DNA obtained was used for quantification of the different bacterial populations (*Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia coccoides* group, *Clostridium leptum* group, *Lactobacillus* group and *Faecalibacterium prausnitzii*) by quantitative PCR as previously described [14].

Serum levels of C-reactive protein (CRP) were determined by CRP Human Instant ELISA (eBioscience).

Malondialdehyde (MDA) concentrations in serum were determined with the spectrophotometric method of lipid peroxidation LPO-586 (Byoxytech, Oxis International, S.A., France). This kit uses the reaction of a chromogenic reagent with MDA, without interference from 4-hydroxyalkenals (hydrochloric acid solvent procedure), in aqueous samples at 45°C . One molecule of MDA reacts with 2 molecules of reagent to yield a stable chromophore with maximal absorbance at 586 nm [15]. The within-run coefficient of variation ranged from 1.2% to 3.4%, depending on the concentration of MDA.

Total antioxidant capacity (TAC) in serum was determined with the colorimetric assay P40117 (Innoprot, Innovative Technologies in Biological Systems, S.L., Spain). In this method, Cu^{2+} is converted to Cu^+ by both small molecules and protein. The reduced ion is chelated with a colorimetric probe giving a broad absorbance peak around 450 nm, proportional to the TAC [16].

Serum cholesterol was measured using cholesterol oxidase, esterase and peroxidase; triglycerides by the lipase method and glucose by the hexokinase one, all of them analyzed with a DimensionXpand plus (Siemens, Erlangen, Germany) and in an independent laboratory (Análisis Clínicos Blanco. Gijón, Asturias, Spain).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0 (SPSS-Inc., Chicago). Data are presented as means \pm SD for continuous variables and percentage for categorical ones. Goodness of fit to normal distribution was investigated by Kolmogorov-Smirnov test. Given that the intake of anthocyanins, dihydrochalcones, dihydroflavonols, flavones, total phenolic acids, hidroxibenzoic and hidroxicinnamic acids and stilbenes intake and fecal levels of *Clostridium leptum* showed a skewed distribution, they were logarithmically transformed for statistical analysis. All the variables included in this work were analyzed according to the intake of red wine. For this purpose, the sample was divided between those who had consumed red wine during the previous year and those had not consumed it along this period of time. Thus, a dichotomous variable was created between non-consumers (n=16) and consumers (n=22) of this beverage. Significant differences between means were calculated by multivariate-analysis of variance to allow for covariate adjusting. Gender, body

mass index and energy intake were included as covariates in the model. For descriptive purposes mean and SD were presented on untransformed variables. Pearson bivariate correlations between fecal microbial groups and serum MDA, CRP and TAC were also carried out. The conventional probability value (0.05) for significance was used in the interpretation of results.

RESULTS

General characteristics of the sample, energy, cholesterol and ethanol intake, serum levels of cholesterol, triglycerides and glucose, together with body mass index and smoking habit, distributed by red wine consumption, are shown in Table 1. Values of all the variables evaluated were similar in both samples with the exception of ethanol intake, which was higher in the consumers.

Daily mean intake of polyphenol classes and subclasses, according to red wine consumption, is presented in Table 2. The intake of flavonoids and stilbenes was higher in the consumers. Anthocyanins, dihydroflavonols and flavanols were the flavonoids slightly increased in this group of subjects, together with hydroxybenzoic and hydroxyphenylacetic acids within phenolic acids.

The differences in the fecal levels of intestinal microbial groups as well as in the serum biochemical parameters between red wine consumers and non-consumers were also investigated (Table 3). With regard to the fecal microbial populations, subjects with a regular consumption of red wine had lower levels of *Bifidobacterium*, *B. coccoides*, *C. leptum* and *Lactobacillus*. This group also presented lower serum concentrations of MDA. No significant differences were found for serum levels of CRP and TAC.

To examine whether fecal microbiota may be associated with the levels of oxidative stress and inflammation, Pearson bivariate correlations between bacterial groups and serum parameters were performed (Table 4). A positive association was found between MDA and *B. coccoides* and *Lactobacillus*, whereas no statistically significant differences were found for MDA and the rest of the microbial groups analyzed, or between these groups and CRP or TAC.

DISCUSSION

In literature a wide range of beneficial health effects have been attributed to the moderate consumption of red wine [17]. Our data highlighted that the consumption of this beverage in the context of a regular diet could be associated with reduced levels of MDA and hence with lower lipid peroxidation in our human sample. This effect has been traditionally attributed to the antioxidant capacity of the compounds present in red wine. However, although red wine consumption contributed to a higher flavonoid, phenolic acid and stilbene intake in the sample, this was too low to observe any differences in the pool of total polyphenol intake between consumers and non-consumers. Accordingly, we also did not find differences in serum antioxidant status between both groups. This finding differs from previous studies reporting a positive association between red wine intake and total antioxidant capacity in serum [18-20]. In this regard, some factors should be considered: first, the mean consumption of red wine in our study (100.07 ml/day) is much lower than the 375-400 ml/day reported by others [9,21]; second, it is likely that the effect from supplementation studies with high doses of red wine during short periods of time (2-4 weeks) has a different effect with respect to that of regular consumption. It is also likely that the variability in the consumption of this beverage could exert different effects between subjects.

Moreover, it is of special interest to consider the potential role of the rest of the polyphenols or antioxidants ingested in the diet since, as we observed in this study, the amount of antioxidants provided by other food groups, such as fruits or vegetables, could counteract the differences in the total antioxidant pool between consumers and non-consumers. It should also be taken into account that the grape variety, cultivation, processing and ageing of wine can determine the final polyphenol content of red wines [22].

The linkage between red-wine consumption and health is under investigation. MDA is one of the most abundant products of lipid peroxidation cytotoxins formed in foods or endogenously and it is probably the most widely used marker of lipid peroxidation in humans [23,24]. There is no consensus in literature about the usefulness of MDA in predicting risk of mortality, but comparison with previous studies in other human populations of serum concentrations of this compound reveal that red wine consumers in our sample had similar concentrations of MDA to those found in subjects with a lower risk of mortality [25]. Apart from the impact of red wine on oxidative stress, light to moderate red wine consumption has also been associated with reduced inflammation [19]. We have not found significant differences in CRP concentrations between red wine consumers and non-consumers. Although CRP has been identified by several authors as significant predictor of cardiovascular events, the concentrations found in the total of the sample are within the low risk range (0.11-0.55 mg/dl) previously described [26].

Recent studies have indicated that the intestinal microbiota may be responsible, in part, for the beneficial effects described for red wine polyphenols as the bacterial modification of these compounds, resulting in metabolites with greater

intestinal absorption than the original phenolic compounds and improved antioxidant activity at systemic level [27-32]. Some authors have proposed that all individuals have their own unique signature of intestinal microbiota, the composition of which could be modulated by long-term changes in diet [31,33,34]. We found that the dominant microbiota in the feces of the regular red wine consumer and the non-consumer groups was slightly different. Red wine consumers had lower levels of *Blautia coccoides*, *Clostridium leptum*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, which is in accordance with the antibacterial activity of polyphenols reported in other studies [35-37]. It is probably that the cell-wall structure of the different bacterial groups could determine their susceptibility to the antimicrobial effect of phenolic compounds, Gram-positive being more sensitive than Gram-negative [38-40]. The levels of *Akkermansia*, *Bacteroides* and *F. prausnitzii* were no different between consumers and non-consumers, suggesting that these microorganisms may be less sensitive to the “antimicrobial” effect of phenolic compounds, or that they may benefit from the antioxidant activity. Other authors have found increased levels of microbial groups from Proteobacteria and Fusobacteria after supplementation with this beverage [41]. Although epidemiological analyses did not establish causality, together with the limited sample size, the positive correlations observed between MDA and *B. coccoides* and *Lactobacillus* are in agreement with the hypothesis we have put forward; regarding the implication of changes in the microbiota in the beneficial effects attributable to this beverage. In a future, it will be desirable to extend the sample size, in order to increase the statistical power of the study and to stratify the consumption of red wine in low-medium-high consumers to deepen in the association between this beverage with the intestinal microbiota and oxidative stress, and to find out whether it is dose-dependent.

CONCLUSION

Regular consumption of red wine appears to be associated with a reduced serum lipoperoxidation in which the intestinal microbiota may be involved.

REFERENCES

1. Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G: Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". *Semin Thromb Hemost* 36(1):59-70, 2010.
2. Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM, Hennekens CH: Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation* 100(9):944-50, 1999
3. Burns J, Gardner PT, Matthews D, Duthie GG, Lean ME, Crozier A: Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J Agric Food Chem* 49(12):5797-808, 2001.
4. Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ: Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ* 312(7033):731-6, 1996.
5. Rodríguez-Delgado MA, González-Hernández G, Conde-González JE, Pérez-Trujillo JP: Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry* 78:523-32, 2002.
6. Iriti M: Editorial: introduction to polyphenols, plant chemicals for human health. *Mini Rev Med Chem* 11(14):1183-5, 2011.
7. Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE: Natural antioxidants in grapes and wine. *J Agric Food Chem* 42:64-9, 1994.
8. Estruch R, Sacanella E, Mota F, Chiva-Blanch G, Antunez E, Casals E, Deulofeu R, Rotilio D, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM, de GG, Urbano-Marquez A: Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases

- erythrocyte superoxide dismutase activity: a randomised cross-over trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21(1):46-53, 2011.
9. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P: Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J* 6:27, 2007.
 10. Van Duynhoven JP, Vaughan EE, Jacobs M, Kemperman RA, van Velzen EJ, Gross G, Roger LC, Prosemiers S, Smilde AK, Doré J, Westerhuis JA, Van de Wiele T: Microbes and Health Sackler Colloquium: Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4531-8, 2010.
 11. Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, González S: Fibers from regular diet are directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly. *Nutr Res* 33(10):811-813, 2013.
 12. Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética (CESNID). Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Barcelona: McGraw-Hill: Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona, 2008.
 13. Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du CL, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A: Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)* 2010; 2010:bap024.
 14. Salazar N, López P, Valdés L, Margolles A, Suárez A, Patterson AM, Cuervo A, De los Reyes-Gavilán CG, Ruas-Madiedo P, González S, Gueimonde M: Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly. *J Am Coll Nutr*, in press, 2013.
 15. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J: Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-

- hydroxylkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11(10):1176-83, 1998.
16. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE, Altun M: Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radic Res* 39(9):949-61, 2005.
 17. Magrone T, Jirillo E: Potential application of dietary polyphenols from red wine to attaining healthy ageing. *Curr Top Med Chem* 11(14):1780-96, 2011.
 18. Avellone G, Di G, V, Campisi D, Alonzo G, Gambino L, Avellone G, De SR, Raneli G, Novo S: Effects of two Sicilian red wines on some cardiovascular risk factors. *Ital Heart J Suppl* 5(5):382-8, 2004.
 19. Avellone G, Di G, V, Campisi D, De SR, Raneli G, Scaglione R, Licata G: Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr* 60(1):41-7, 2006.
 20. Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, Steele GM: The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 52(10):733-6, 1998.
 21. Tsang C, Higgins S, Duthie GG, Duthie SJ, Howie M, Mullen W, Lean ME, Crozier A: The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Br J Nutr* 93(2):233-40, 2005.
 22. Shahidi F, Naczki M. Wine. In Technomic Publishing Co. (ed). "Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications". Pennsylvania, p. 136-48, 2013.
 23. Hadley M, Draper HH: Identification of N-(2-propenal)ethanolamine as a urinary metabolite of malondialdehyde. *Free Radic Biol Med* 6(1):49-52, 1989.
 24. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ,

- Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC: Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med* 38(6):698-710, 2005.
25. Huerta JM, Gonzalez S, Fernandez S, Patterson AM, Lasheras C: Lipid peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: a five-year longitudinal study. *Free Radic Res* 40(6):571-8, 2006.
26. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342(12):836-43, 2000.
27. Aura AM: Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev* 7:407-29, 2008.
28. Crozier A: Dietary phenolics, absorption, mammalian and microbial metabolism and colonic health. *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 1:S5-S6, 2009.
29. Del Rio D, Costa LG, Lean MEJ, Crozier A: Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr Metab Cardiovasc* 20:1-6, 2010.
30. Monagas M, Urpi-Sarda M, Sanchez-Patan F, Llorach R, Garrido I, Gomez-Cordoves C, Andres-Lacueva C, Bartolome B: Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct* 1(3):233-53, 2010.
31. Selma MV, Espin JC, Tomas-Barberan FA: Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* 57(15):6485-501, 2009.
32. Williamson G, Clifford MN: Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr* 104 Suppl 3:S48-S66, 2010.
33. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J,

- O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van SD, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW: Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488(7410):178-84, 2012.
34. Duda-Chodak A: The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol* 63(5):497-503, 2012.
35. Dolara P, Luceri C, De FC, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A: Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat Res* 591(1-2):237-46, 2005.
36. Jung CM, Heinze TM, Schnackenberg LK, Mullis LB, Elkins SA, Elkins CA, Steele RS, Sutherland JB: Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 297(2):266-73, 2009.
37. Rodríguez Vaquero MJ, Alberto MR, Manca de Nadra MC: Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Contr* 18:93-101, 2007.
38. Kemperman RA, Bolca S, Roger LC, Vaughan EE: Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology* 156(Pt 11):3224-31, 2010.
39. Sirk TW, Brown EF, Friedman M, Sum AK: Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity. *J Agric Food Chem* 57(15):6720-8, 2009.
40. Smith AH, Mackie RI: Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70(2):1104-15, 2004.
41. Queipo-Ortuno MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, Cardona DF, Andres-Lacueva C, Tinahones FJ. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr* 95(6):1323-34, 2012.

Table 1. General characteristics of the study sample according to the consumption of red wine.

	Non-consumption (N = 16)	Consumption (N = 22) ^a
Age (y)	61.44 ± 2.58	60.73 ± 3.74
Male sex (%)	25.0	31.8
Energy intake (kcal/d)	1798.81 ± 368.74	2022.29 ± 650.16
Cholesterol intake (mg/d)	282.71 ± 88.23	323.12 ± 141.15
Ethanol intake (g/d)	2.24 ± 5.00	12.01 ± 9.12 **
Serum cholesterol (mg/dl)	237.19 ± 26.12	228.05 ± 44.94
Serum triglycerides (mg/dl)	113.31 ± 30.82	119.55 ± 64.85
Serum glucose (mg/dl)	98.63 ± 16.66	97.09 ± 10.61
BMI (kg/m²)	26.26 ± 3.70	25.51 ± 3.18
Smoking habit (%)	24.4	30.0

^a Mean intake of red wine = 100.07 ml/d.

Results are presented as mean ± SD and percentage (%).

BMI = Body Mass Index

** p ≤ 0.001

Table 2. Mean intake of polyphenol classes and subclasses according to the consumption of red wine.

	Non-consumption (N = 16)	Consumption (N = 22) ^a
Total polyphenols (mg/d)	2310.07 ± 1081.53	2364.06 ± 1051.47
Flavonoids (mg/d)	368.70 ± 196.10	562.61 ± 292.11 *
Anthocyanins	4.68 ± 11.30	45.72 ± 48.60 *
Dihydrochalcones	3.39 ± 2.27	2.64 ± 3.11
Dihydroflavonols	0.83 ± 2.72	5.46 ± 4.34 *
Flavanols	153.24 ± 133.46	290.26 ± 201.86 *
Flavanones	148.30 ± 96.77	163.45 ± 206.98
Flavones	4.40 ± 3.18	4.29 ± 6.27
Flavonols	53.86 ± 55.24	50.81 ± 32.27
Phenolic acids (mg/d)	119.37 ± 67.47	197.04 ± 201.48
Hydroxybenzoic acids	5.53 ± 3.92	25.40 ± 31.80 *
Hydroxycinnamic acids	113.76 ± 66.04	171.43 ± 190.27
Hydroxyphenylacetic acids	0.08 ± 0.12	0.21 ± 0.16 *
Stilbenes (mg/d)	0.56 ± 1.71	3.57 ± 2.76 **
Lignans (mg/d)	0.97 ± 0.46	1.02 ± 0.32
Other polyphenols (mg/d)	10.93 ± 5.16	17.46 ± 13.02

^a Mean intake of red wine = 100.07 ml/d.

Analysis adjusted by gender, body mass index and energy intake.

Results are presented as estimated marginal means ± SD on untransformed variables.

* p ≤ 0.05 ** p ≤ 0.001

Table 3. Mean values of fecal microbial groups and biochemical parameters according to the consumption of red wine.

	Non-consumption (N = 16)	Consumption (N = 22) ^a
Microbial groups (log no. cells/g):		
<i>Akkermansia</i>	6.64 ± 1.93	6.51 ± 1.82
<i>Bacteroides</i>	9.50 ± 0.64	9.31 ± 0.65
<i>Bifidobacterium</i>	8.32 ± 0.78	7.89 ± 0.58 *
<i>Blautia coccooides</i>	8.57 ± 0.86	6.89 ± 1.59 **
<i>Costridium leptum</i>	10.02 ± 0.38	9.12 ± 0.82 **
<i>Lactobacillus</i>	6.35 ± 1.23	5.49 ± 1.2 *
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6.90 ± 0.77	6.49 ± 0.75
Biochemical parameters:		
Serum MDA (µM)	2.18 ± 0.44	1.84 ± 0.52 *
Serum CRP (pg/ml)	1641.53 ± 1293.94	1122.05 ± 1079.37
Serum TAC (mM)	0.35 ± 0.08	0.33 ± 0.09

^a Mean intake of red wine = 100.07 ml/d.

MDA = Malondialdehyde; CRP = C-Reactive Protein; TAC = Total Antioxidant Capacity

Analysis adjusted by gender, body mass index and energy intake.

Results are presented as estimated marginal means ± SD on untransformed variables.

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$

Table 4. Pearson bivariate correlations between serum biochemical parameters and fecal microbial groups (log no. cells/g).

	Serum MDA (μM)	Serum CRP (pg/ml)	Serum TAC (mM)
<i>Akkermansia</i>	-0.125	0.203	-0.168
<i>Bacteroides</i>	-0.067	0.124	-0.126
<i>Bifidobacterium</i>	0.043	0.125	0.008
<i>Blautia coccooides</i>	0.443*	0.203	0.170
<i>Clostridium leptum</i>	0.183	0.192	0.127
<i>Lactobacillus</i>	0.331*	0.168	0.201
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	-0.195	0.085	0.069

(N = 38) MDA = Malondialdehyde; CRP = C-Reactive Protein; TAC = Total Antioxidant Capacity. * $p \leq 0.05$

PUBLICACIÓN 5

**Nutrición
Hospitalaria**

 Nutr Hosp. 2013;28(2):474-478
 ISSN 0212-1611 • CODEN NUH0EQ
 S.V.R. 318

Original

Fatty acids intake and immune parameters in the elderly

 Sonia González¹, Patricia López^{1,2}, Abelardo Margolles², Ana Suárez¹, Ángeles M. Patterson¹,
 Adriana Cuervo¹, Clara G. de los Reyes-Gavilán² and Miguel Gueimonde²
¹Department of Functional Biology. University of Oviedo. Oviedo. Asturias. Spain. ²Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Villaviciosa. Asturias. Spain.

Abstract

Introduction: The rapid increase on life-expectancy represents a major challenge and economic burden for modern societies. Several studies have focused on the effects of polyunsaturated fatty acids (PUFA) upon the immune system; however less attention has been paid to the effects of monounsaturated fatty acids (MUFA). In this work we investigated the relationship of habitual consumption of different types of fatty acids with different immune parameters in the elderly.

Subjects and methods: 40 institutionalized elderly (76-95 y) and 35 home-living middle-age subjects (57-65 y) were recruited. Dietary intakes of macronutrients, fiber and fatty acids, as well as immune parameters such as serum cytokines levels (IL-10, TNF- α , IL-8, IL-17, TGF- β and IL-12), phagocytic activity and cytotoxic NK activity, were determined.

Results: Elderly subjects had a lower intake of total lipids. MUFA intake was significantly lower in the elderly group than in middle-age adults whilst the contrary was true for PUFA. MUFA intake in the elderly was found to be positively associated with IL-12 ($\beta = 0.879$) and TNF- α ($\beta = 0.789$) serum concentrations, whilst PUFA intake was inversely related to levels of IL-12 ($\beta = -0.534$). These associations were not observed in the middle-age group.

Conclusion: MUFA intake may contribute to the pro-inflammatory status present in the elderly. It may be advisable to develop future nutrient recommendations specific for elderly taking into account immune parameters.

(Nutr Hosp. 2013;28:474-478)

DOI:10.3305/nh.2013.28.2.6183

Key words: Fatty acids. MUFA. Elderly. Immune parameters. Cytokines.

 Correspondence: Miguel Gueimonde.
 Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products.
 Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA).
 Paseo Río Linares, s/n.
 33300 Villaviciosa. Asturias. Spain.
 E-mail: mgueimonde@ipla.csic.es

Recibido: 18-IX-2012.

Aceptado: 23-X-2012.

 INGESTA DE ÁCIDOS GRASOS Y PARÁMETROS
 INMUNES EN ANCIANOS

Resumen

Introducción: El rápido aumento de la esperanza de vida en las sociedades desarrolladas representa un gran desafío y supone una elevada carga económica. Numerosos trabajos han estudiado los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) sobre el sistema inmune, sin embargo los efectos de los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) han recibido mucha menos atención. En este trabajo se investigó la relación del consumo habitual de los diferentes tipos de ácidos grasos con diversos parámetros inmunológicos en ancianos.

Individuos y métodos: Se reclutaron 40 ancianos institucionalizados (79-95 años) y 35 individuos de mediana edad (57-65 años) que residían en sus hogares. Se determinó la ingesta diaria de macronutrientes, fibra y ácidos grasos, así como diversos parámetros inmunes; niveles séricos de citoquinas (IL-10, TNF- α , IL-8, IL-17, TGF- β e IL-12), actividad fagocítica y actividad citotóxica de células NK.

Resultados: Los voluntarios ancianos presentaron una menor ingesta de lípidos totales. La ingesta de AGM fue significativamente menor en el grupo de ancianos que en los adultos de mediana edad, mientras que lo contrario fue cierto para los AGP. La ingesta de AGM en ancianos se asoció positivamente con las concentraciones de IL-12 ($\beta = 0.879$) y TNF- α ($\beta = 0.789$), mientras que la ingesta de AGP mostró una relación inversa con los niveles de IL-12 ($\beta = -0.534$). Estas asociaciones no fueron observadas en el grupo de mediana edad.

Conclusión: La ingesta de AGM podría contribuir al estado pro-inflamatorio presente en los ancianos. Sería aconsejable desarrollar recomendaciones nutricionales específicas para ancianos teniendo en cuenta parámetros inmunológicos.

(Nutr Hosp. 2013;28:474-478)

DOI:10.3305/nh.2013.28.2.6183

Palabras clave: Ácidos grasos. Ácidos grasos monoinsaturados. Ancianos. Parámetros inmunes. Citoquinas.

Abbreviations

EPIC: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.

FA: Fatty acids.

FFQ: Food frequency questionnaire.

IL-10: Interleukin 10.

IL-12: Interleukin 12.

IL-17: Interleukin 17.

IL-8: Interleukin 8.

MUFA: Monounsaturated fatty acids.

NK: Natural killer cells.

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells.

PUFA: Polyunsaturated fatty acids.

SFA: Saturated fatty acids.

TGF- β : Transforming growth factor-beta.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha.

Introduction

During the last century there has been a continuous rise on life-expectancy,¹ representing a challenge and economic burden for modern societies. Aging has been related with altered immune function, or more precisely age-associated immune deregulation,² including decreased proliferative response to mitogens, low activity of natural killer (NK) cells^{3,4} and increased levels of pro-inflammatory cytokines.^{5,6} These changes on immune function, commonly called immunosenescence, may explain the high susceptibility of elderly people to disease. Correction of these age-related changes constitutes a target for the development of nutritional intervention strategies directed to the elderly population.

Although under-nutrition appears to be one of the main factors that could induce altered immune responses in aged individuals,² during the last decade several studies have evaluated the effects of amount, type and quality of dietary fat on the human immune response.⁷ Dietary fatty acids (FA) have been considered as regulators of inflammatory burden, n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) being reported as having inflammatory capacities, while the n-3 series present anti-inflammatory effects.^{8,9} However, less attention has been paid to the effects of monounsaturated fatty acids (MUFA) upon the immune system. MUFA have been traditionally considered as neutral fatty acids and have often been used as placebo in studies investigating the anti-inflammatory properties of other FA.¹⁰ However, they may also be able to modulate the immune system¹¹ and have been used in the resolution or attenuation of disease.¹²

The net effect of dietary fat on immune response is likely an outcome of the interaction between several factors, including total fat, type of fat, ratios between dietary FA and nutrient status. The components in foods that improve immune functions are still far from fully understood and, therefore, studies on the effect of

diet are still required. We investigated here the effects of consumption of FA on different immune parameters in elderly.

Subjects and methods

Participants

The study sample included 75 volunteers from Asturias region (Northern Spain). The elderly group was comprised by 40 institutionalized volunteers (31 females, 9 males; age from 76 to 95 years, mean 81.8 years). A group of 35 middle-age subjects (25 females, 10 males; 57 to 65 years old, mean 60.5) living at their homes, was included for comparison. Exclusion criteria were previous diagnosis of cancer, autoimmune or digestive diseases and consumption of probiotics/prebiotics or antibiotics during the previous month. Participants were mentally and physically able to participate in the study and gave their written informed consent. Ethical approval was obtained from the Committee on Ethical Research of the Oviedo University Hospital.

Nutritional assessment

Dietary intake was assessed by means of a semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ), method that has been widely used by our group in other studies. Trained dieticians asked about cooking practices, number and amount of ingredients used in each recipe, as well as questions concerning menu preparation (e.g., type of oil used, type of milk). During an interview, subjects were asked item-by-item whether they usually ate each food and, if so, how much they used to eat. For this purpose, 3 different serving sizes of each cooked food were presented in pictures to the participants so that they could choose from up to 7 serving sizes (from "less than the small one" to "more than the large one"). For some of the foods consumed, amounts were recorded in household units, by volume, or by measuring with a ruler. Food intake was analyzed for energy and macro- and micronutrients content by using the nutrient Food Composition Tables developed by the CSIC.¹³ Fatty acids were obtained from the Food Composition Tables of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) group of Spain. Subjects were also asked about whether they were following a special diet due to health problems such as chewing impairment, diabetes or hypercholesterolemia.

Immune measurements

A heparinized whole blood sample was taken from each subject immediately after the nutritional assessment period. The capacity of blood leucocytes to

Table I
Nutritional characteristics of the study population according to age groups

Nutritional parameters (g/d)	Middle age (n = 35)	Elderly (n = 40)
	Mean (sd)	Mean (sd)
Proteins	89.69 (26.62)	84.79 (18.56)
Carbohydrates	185.39 (86.43)	244.53 (54.73)**
Fiber	18.35 (9.00)	18.33 (4.16)
Lipids	107.76 (30.72)	90.95 (24.41)*
SFA	35.12 (9.55)	38.36 (12.94)
MUFA	50.99 (14.47)	20.48 (7.98)**
PUFA	13.15 (6.61)	19.75 (6.33)*

¹Mean values were adjusted for gender and energy intake (55-65 y = 2,269.13 ± 614.49 and 66-95 y = 1,919.93 ± 451.29 kcal/d).

*p value < 0.05 and **p < 0.01.

phagocytose *Escherichia coli* was quantified in a FACSCanto II Flow Cytometer (Becton Dickinson, BD Biosciences, San Diego, CA) by using the Phagotest® kit (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany). For cytotoxic activity, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifugation over Ficoll-Hypaque gradients (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway), counted and adjusted to 5×10^6 cells/mL. Then, natural killer (NK) cell activity was determined by specific target lysis of labelled K562 cells by flow cytometry, using the NKtest® kit (Orpegen Pharma).

Levels of serum IL-10, TNF- α , IL-8, IL-17, and IL-12 were quantified using a multiplex immunoassay (Cytometric Bead Array, CBA, BD Biosciences) by flow cytometry. The concentration of transforming growth factor (TGF)- β was determined by ELISA (BD OptEIA™, BD Biosciences).

Statistical analyses

Results were analyzed using the SPSS software (SPSS Inc. Chicago, USA). Goodness of fit to normal

distribution was investigated with the Kolmogorov-Smirnov test. Significant differences in mean of nutritional and immunological parameters by age group were tested by using generalized linear models using gender and energy as covariates. Pearson's correlation coefficient analyses were conducted between immune variables and lipid and FA intake. Linear regression analyses were adjusted for gender. FA intake was expressed as percentage of total energy intake. Statistical parameter presented is (standardized regression coefficient). Differences were considered significant at $P < 0.05$ level.

Results

Table I shows the intake of protein, carbohydrates, fiber and lipids in both volunteer groups. The elderly group had a higher consumption of carbohydrates and a lower lipid intake than the middle-age group (table I). However, whilst MUFA intake was significantly lower in the elderly group the contrary was true for PUFA intake.

When Pearson's correlation coefficient between diet and immune variables was analyzed, no meaningful correlation was found for the adult group. However, whilst no correlations were observed in the elderly for TGF- β , IL8, IL-17, IL-10 or phagocytic activity (data not shown), some significant correlations were found for TNF- α , IL-12 and NK activity (table II). SFA and MUFA intake in elderly was positively correlated with TNF- α ($r = 0.317$ and 0.444 , respectively) and IL-12 ($r = 0.412$ and 0.402 , respectively). Additionally, MUFA intake was inversely correlated with NK cytotoxic activity ($r = -0.319$). Moreover, when the elderly group was classified according to the compliance with the current dietary recommendations for MUFA (> 15% of energy intake), it was found that elderly fulfilling the recommendation ($n = 11$) presented significantly higher plasma concentration of the pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF- α than those with intakes below the recommendation value ($n = 29$) (IL-12: 14.2 ± 12.9 vs. 2.9 ± 5.0 pg/mL and TNF- α : 12.0 ± 12.8 vs. $1.5 \pm$

Table II
Bivariate correlations between lipid and fatty acid intake with immune parameters

	Lipids	SFA	MUFA	PUFA
TNF-α (pg/mL)				
Adults	-0.136	-0.086	-0.084	-0.112
Elderly	0.219	0.317*	0.444**	-0.021
IL-12 (pg/mL)				
Adults	-0.039	-0.043	0.002	0.009
Elderly	0.120	0.412**	0.402*	-0.178
NK activity (%)				
Adults	-0.045	-0.007	-0.069	-0.065
Elderly	-0.186	-0.190	-0.319*	-0.023

*p value < 0.05 and **p < 0.01. Pearson's correlation coefficient analysis.

Table III
Multivariate regression analysis of lipid and fatty acids intake on serum IL-12, TNF- α and NK activity by age

	Adults (n = 35)		Elderly (n = 40)	
	B	CI (95%)	B	CI (95%)
IL-12				
Lipid intake ¹	-1.378	(-0.704, 0.218)	-0.205	(-1.353, 0.463)
SFA ¹	0.482	(-0.334, 0.818)	0.104	(-0.381, 0.810)
MUFA ¹	0.846	(-0.256, 0.781)	0.879	(2.015, 5.554)**
PUFA ¹	0.345	(-0.332, 0.804)	-0.534	(-3.689, -0.662)**
TNF-α				
Lipid intake ¹	-1.117	(-1.054, 0.395)	-0.101	(-1.263, 0.825)
SFA ¹	0.331	(-0.640, 1.171)	0.017	(-0.650, 0.719)
MUFA ¹	0.710	(-0.463, 1.167)	0.789	(1.348, 5.416)**
PUFA ¹	0.164	(-0.714, 1.072)	-0.407	(-3.390, 0.089)
NK activity				
Lipid intake ¹	1.420	(-2.355, 7.949)	0.013	(-2.724, 2.853)
SFA ¹	-0.375	(-8.596, 3.961)	0.023	(-1.717, 1.940)
MUFA ¹	-0.838	(-8.711, 2.835)	-0.519	(-10.588, 0.275)
PUFA ¹	-0.410	(-9.554, 3.361)	0.271	(-2.097, 7.194)

Analyses were adjusted by sex. ¹As percentage of total energy. **p < 0.01.

5.7 pg/mL, respectively), whilst the contrary was true for NK activity (32 ± 20% vs. 50 ± 20%).

To further assess these associations, the relationships between fatty acids and preselected immune parameters were analyzed by linear regression analysis (table III). No statistically significant effects were found for total lipids or SFA. However, intake of MUFAs was found to be associated with IL-12 and TNF- α serum concentration in elderly. PUFA intake was inversely related to levels of IL-12, however, it did not explain the variations in serum TNF- α . On the other hand, no significant associations between total lipids or FA intake and NK cell activity were found. These associations were independent from gender.

Discussion

It is known that ageing is related with changes in the immune system,^{5,6} a phenomena commonly called “immunosenescence”. This points out at the need of developing strategies to counteract these changes and restoring the immune parameters in elderly.

In this study a detailed dietary assessment was carried out and associations between dietary FA and different immune variables were studied. Several authors have suggested that certain dietary FA, particularly PUFA, play an important role on the health of the individual, having anti-inflammatory properties.¹⁴ However, whilst extensive research has been conducted on PUFA, less attention has been paid to MUFA, which have been often used as placebo in studies assessing the effects of PUFA on immune function.¹¹ Nevertheless, MUFA may not be

as immunologically neutral as previously expected and their use as placebo can be questioned.^{11,15} The positive association between MUFA intake and some pro-inflammatory cytokines (IL-12 and TNF- α) observed in our elderly population appears to emphasize this observation. This association between MUFA intake and pro-inflammatory cytokines was not confirmed in middle-age subjects, which, however, had a higher contribution of MUFA to energy intake, suggesting that either there is a threshold level for the effect of MUFAs on immune system or other factors related with senescence may also play a role.

It is widely known that malnutrition induces an attenuation of immune functions and it may be an important confounding factor in studies associating age with decreased immune response.² Nevertheless, the elderly cohort under study had an adequate energy and protein intake, which was comparable to that of the middle-age group. Therefore, the different behavior observed between groups seems to be associated with age but does not appear to be a cumulative effect with nutritional status.

Despite the limited sample size our results emphasize the relationship between FA intake and inflammatory status at senescence. We observed that elderly fulfilling the current dietary MUFA recommendation presented higher plasma concentration of pro-inflammatory cytokines than those with intakes below the recommended level. These observations together with the positive correlation between these cytokines and MUFA intake in elderly subjects, which may exacerbate that inflammatory status, appear to indicate the need for reassessing the validity of the current general FA intake recommendations in the elderly population.

Acknowledgments

This work was funded by Biopolis SL. within the framework of the e-CENIT Project SENIFOOD from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We show our greatest gratitude to all the volunteers participating in the study.

References

- Christensen K, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet* 2009; 374: 1196-1208.
- Mazari L, Lesourd BM. Nutritional influences on immune response in healthy aged persons. *Mech Ageing Dev* 1998; 104: 25-40.
- Jing Y, Gravenstein S, Chaganty NR, Chen N, Lyerly KH, Joyce S, Deng Y. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. *Exp Gerontol* 2007; 42: 719-732.
- Candore G, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Lio D, Listi F, Scola L, Vasto S, Caruso C. Immunosenescence and Anti-Immunosenescence Therapies: The Case of Probiotics. *Rejuvenation Res* 2008; 11: 425-432.
- Candore G, Caruso C, Jirillo E, Magrone T, Vasto S. Low Grade Inflammation as a Common Pathogenic Denominator in Age-Related Diseases: Novel Drug Targets for Anti-Ageing Strategies and Successfully Ageing Achievement. *Curr Pharma Des* 2010; 16: 584-596.
- Vallejo AN. Immunological hurdles of ageing: Indispensable research on the human model. *Ageing Res Rev* 2011; 10: 315-318.
- Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002; 43: 445-452.
- James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 343S-348S.
- Mesa García MD, Aguilera García CM, Gil Hernández A. Importancia de los lípidos en el tratamiento nutricional de patologías de base inflamatoria. *Nutr Hosp* 2006; 21 (Suppl. 2): 30-43.
- Virella G, Fourspring K, Hyman B. Immunosuppressive effects of fish oil in normal human volunteers: correlation with the in vitro effects of eicosapentanoic acid on human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 61: 161-176.
- Yaqoob P. Monounsaturated fats and immune function. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 453-465.
- Fetterman JW, Zdanowicz MM. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66: 1169-1179.
- Andujar MM, Moreiras O. Tablas de Composición de Alimentos. CSIC 1994.
- Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 2009; 91: 791-795.
- Puertollano MA, Puertollano E, Álvarez de Cienfuegos G, de Pable NA. Aceite de oliva, sistema inmune e infección. *Nutr Hosp* 2010; 25: 1-8.

TABLAS ADICIONALES

La asociación entre la ingesta de los distintos lípidos de la dieta y los parámetros inmunológicos, en adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada, presentada en la Publicación 5, se completa con los resultados mostrados a continuación. La asociación entre la ingesta de vitaminas C, E, A y β -caroteno y las concentraciones séricas de IL-8, IL-10, IL-12, TGF- β , TNF- α y proteína C reactiva (PCR), el porcentaje de fagocitosis de monocitos y granulocitos y la actividad citotóxica de las células NK en adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada se presenta en la Tabla 11. En el grupo de mediana edad se encontró una asociación positiva entre la ingesta de vitamina E y la concentración de TGF- β , mientras que en los sujetos de edad avanzada, la ingesta de vitamina C se correlacionó negativamente con las concentraciones de IL-12, TGF- β , TNF- α y PCR, y positivamente con la actividad citotóxica de las células NK. En este último grupo de edad, la vitamina A fue, asimismo, negativamente asociada con las concentraciones de TGF- β y proteína C reactiva.

Con el fin de profundizar en la correlación entre la ingesta de estas vitaminas y los parámetros inmunológicos, las asociaciones encontradas fueron, posteriormente, examinadas mediante modelos de regresión lineal incluyendo sexo e ingesta de energía como covariables (Tabla 12). No encontramos diferencias significativas para la asociación previa entre la ingesta de vitamina E y TGF- β en adultos de mediana edad, mientras que en personas de edad avanzada, la vitamina C fue negativamente asociada con las

concentraciones de IL-12 y TNF- α y, por el contrario, positivamente relacionada con la actividad citotóxica de las células NK.

Tabla 11. Correlaciones bivariadas entre la ingesta de vitaminas y los parámetros inmunológicos, en adultos de mediana edad y personas de edad avanzada.

		Vitamina C (mg/d)	Vitamina E (mg/d)	β -caroteno (μ g/d)	Vitamina A (μ g/d)
IL-8 (pg/ml)	A	-0,058	-0,109	0,042	-0,031
	B	0,124	-0,245	-0,101	-0,135
IL-10 (pg/ml)	A	-0,025	0,065	-0,084	-0,057
	B	-0,112	-0,114	-0,247	-0,060
IL-12 (pg/ml)	A	-0,123	0,075	-0,022	-0,124
	B	-0,401 *	-0,034	0,112	-0,093
IL-17 (pg/ml)	A	-0,050	0,107	-0,163	-0,069
	B	-0,080	-0,026	-0,208	-0,082
TGF- β (pg/ml)	A	-0,121	-0,415*	-0,082	-0,082
	B	-0,352*	-0,131	-0,161	-0,400 *
TNF- α (pg/ml)	A	-0,106	-0,167	-0,133	-0,162
	B	-0,453 **	0,065	0,096	-0,142
Células NK (%) ^a	A	-0,046	-0,295	-0,156	-0,052
	B	0,381*	0,050	0,095	0,146
Fagocitosis (%) ^b	A	0,135	0,372	-0,071	0,139
	B	0,208	0,040	0,260	0,087
PCR (ng/ml)	A	-0,081	-0,108	-0,096	-0,141
	B	-0,390 *	-0,116	-0,149	-0,407 *

A: adultos de mediana edad (n = 35); B: personas de edad avanzada (n = 40); IL: interleucina; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; PCR: proteína C reactiva. ^a Citotoxicidad de células *natural killer* (NK); ^b fagocitosis de monocitos y granulocitos. Datos presentados como coeficiente de correlación de Spearman.
* p \leq 0,05; ** p \leq 0,01

Tabla 12. Análisis de regresión lineal entre la ingesta de vitaminas y los parámetros inmunológicos, en adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada.

	Variable ^a	β	R ²
Adultos de mediana edad			
Fagocitosis (%) ^b	Vitamina E	-0,437	0,175
Personas de edad avanzada			
IL-12 (pg/ml) ^c	Vitamina C	-0,333	0,195*
TGF- β (pg/ml) ^d	Vitamina C	-0,248	0,198
	Vitamina A	-0,307	0,194
TNF- α (pg/ml) ^e	Vitamina C	-0,432	0,208 *
Células NK (%) ^c	Vitamina C	0,374	0,162 *
PCR (ng/ml) ^g	Vitamina C	-0,294	0,220
	Vitamina A	-0,307	0,195

Adultos de mediana edad (N = 35); Personas de edad avanzada (N = 40). ^a Basado en un análisis de regresión múltiple incluyendo sexo y energía como covariables; ^b fagocitosis de monocitos y granulocitos; ^c citotoxicidad de células *natural killer* (NK). IL: interleucina; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; PCR: proteína C reactiva; R²: coeficiente de múltiples determinaciones; β : coeficiente de regresión estandarizado. * p \leq 0,05

DISCUSIÓN

La evaluación de la dieta que se presenta en esta Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo con especial rigor, dada la experiencia que nuestro grupo presenta en este campo. En base a los objetivos planteados, la elección de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA) como método de registro dietético, radicó en las ventajas que aporta para este tipo de estudios. Este método, en contraste con otros, sacrifica, en cierto modo, la precisión de la medida de la ingesta alimentaria de uno o varios días, a cambio de disponer de una información global de la ingesta en un periodo amplio de tiempo, integrando las variaciones inter-semanales e inter-estacionales, y aportando, de esta manera, información del consumo alimentario desde una perspectiva amplia. Este aspecto adquiere especial relevancia en el estudio de la relación entre la dieta y la microbiota intestinal ya que, aunque se sugiere que esta última es capaz de responder a cambios en la dieta a corto plazo, son los hábitos alimentarios a largo plazo los que determinan su composición y actividad metabólica ⁽⁵⁶⁾.

Los resultados de este trabajo ponen en relieve la importancia para la salud de una dieta abundante en alimentos de origen vegetal, dado que son fuente de nutrientes que juegan un papel importante en el funcionamiento óptimo del sistema inmune y en la prevención del daño por estrés oxidativo; como la vitamina C, cuyo aporte, en el contexto de una dieta adecuada, podría mejorar la respuesta a la infección, a través de un incremento en la actividad de las células NK, así como proteger frente a la inflamación crónica característica del envejecimiento, y base de muchas patologías frecuentes en este periodo de edad. La abundancia de los alimentos de origen vegetal en otros compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria, como son los

polifenoles, contribuye aún más a su efecto protector para el organismo, y así lo sugieren nuestros resultados, con menores niveles de MDA en los sujetos de mediana edad con un consumo regular de una de sus principales fuentes en los países mediterráneos, el vino tinto.

El aceite de oliva es otro de los componentes de la dieta mediterránea que ha recibido especial atención en las últimas décadas, dado su papel en la prevención de algunas enfermedades crónicas. Sin embargo, la asociación positiva encontrada entre el consumo de AGM y los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-12 y TNF- α en ancianos, sugiere que el consumo de estos ácidos grasos podría exacerbar el estado inflamatorio en edades avanzadas, por lo que la recomendación de incluir este alimento en la dieta de las personas mayores debería ser revisada.

La microbiota intestinal podría ser responsable de parte de los efectos beneficiosos para la salud atribuidos a los vegetales. Son fuente de fibra, combustible para el crecimiento de algunos grupos microbianos, como *Lactobacillus*, género probiótico cuyos niveles fecales en adultos de mediana edad se encontraron directamente asociados con el consumo de hemicelulosas y almidón resistente procedentes del pan blanco. Como consecuencia de la degradación de la fibra procedente de la dieta se generan ácidos grasos de cadena corta, compuestos con un amplio rango de efectos positivos para la salud. En este contexto, nuestros resultados han permitido identificar a la celulosa y la pectina insoluble, procedentes del consumo de patata y manzana, como los principales contribuidores a los niveles fecales de estos metabolitos.

En la modulación de las poblaciones bacterianas intestinales también podrían intervenir otros compuestos presentes en los vegetales, como son los polifenoles. Así lo sugieren las asociaciones positivas encontradas, en pacientes de alergia, entre el consumo de ácidos fenólicos procedentes del café y la abundancia de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Clostridium*, y entre los estilbenos del vino tinto y *Bacteroides*; así como entre la ingesta de dihidrocalconas de la manzana y la abundancia de *Bifidobacterium* en pacientes de LES, y entre los dihidroflavanoles del vino tinto y *Faecalibacterium* en sus controles. Sin embargo, mientras el consumo de flavanonas de la naranja se asoció positivamente con la abundancia de *Lactobacillus* en pacientes de LES, en adultos de mediana edad estos flavonoides mostraron una asociación negativa con *B. coccoides* y *C. lempum*, resultados que podrían ser dependientes de la distinta cantidad de flavanonas consumida en estos grupos.

Por lo tanto, aunque los estudios epidemiológicos no permiten establecer causalidad, nuestros resultados podrían aportar algo de luz en el estudio de esta compleja asociación, así como ser de utilidad, en un futuro, a la hora de diseñar estrategias dietéticas específicas que permitan mejorar la calidad de vida de estos colectivos.

EVALUACIÓN DIETÉTICA DE LOS GRUPOS DE POBLACIÓN ESTUDIADOS

1. Adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada

A pesar de vivir en un país desarrollado en el que las carencias alimentarias parecen no tener cabida, ciertos subgrupos de población, como es el caso de los ancianos, presentan un riesgo de malnutrición incrementado en comparación con la población general. El envejecimiento lleva implícito una serie de cambios fisiológicos, que influyen, ya sea de manera directa o indirecta, en la ingesta de alimentos y el aporte de nutrientes, así como en su biodisponibilidad. A ello hay que sumar que la población anciana, frecuentemente, se ve sometida a profundos cambios sociales y económicos que acentúan más aún el riesgo de malnutrición ⁽¹²⁷⁾. Algunos trabajos señalan que hasta una cuarta parte de los individuos de edad igual o superior a los 65 años en nuestro país está en riesgo de malnutrición, y un 4% de ellos presenta desnutrición ⁽¹⁷⁰⁾. En este sentido, la identificación de una menor ingesta, en las personas de edad avanzada evaluadas en este trabajo, de algunos nutrientes como los AGM, β -caroteno, ácido fólico, vitaminas A, B₆, C y D y zinc podría corroborar estas evidencias científicas. Sin embargo, cabe destacar que, en general, la muestra presenta un buen estado nutricional global, únicamente por debajo de las recomendaciones de AGM, ácido fólico, vitamina A, D y E, en consonancia con los resultados publicados en un grupo de población de características similares ⁽¹⁷¹⁾.

Aproximadamente el 70% de los sujetos de edad avanzada no alcanzó las recomendaciones de ácido fólico, cifra que se incrementa aún más

en el caso de la vitamina A, lo que resulta especialmente relevante dada la importancia de estos micronutrientes para la salud ^(10;11;172). En la base de estos bajos aportes podría encontrarse el escaso consumo de frutas y verduras en este grupo de edad ($247,2 \pm 160,9$ g/d en total), alejado de los 400 g/d recomendados por la OMS ⁽¹⁷³⁾, para la reducción del riesgo de morbimortalidad por enfermedades crónicas en edades avanzadas ⁽¹⁷⁴⁻¹⁷⁶⁾. Estos datos también podrían explicar el bajo aporte de otros componentes dietéticos como la fibra y los polifenoles, resultados que coinciden con los presentados en otros estudios llevados a cabo en ancianos ^(177;178). El menor consumo de antioxidantes en este grupo de edad podría ser una de las causas que explique los mayores niveles sanguíneos del marcador de lipoperoxidación MDA. Aunque no existe un valor de referencia para el MDA, con el que comparar nuestros resultados, algunos autores han encontrado que niveles de este compuesto por encima de $0,94 \mu\text{M}$ podrían suponer un incremento entre 3,7- 4,2 veces el riesgo de mortalidad ⁽¹⁷⁹⁾.

Si bien es frecuente que la dieta no aporte las cantidades de vitamina D que nuestro organismo necesita, este aspecto se torna especialmente relevante en el envejecimiento, ya que los cambios asociados a este proceso pueden influir sobre el metabolismo de esta vitamina, comprometiendo su disponibilidad ⁽¹⁸⁰⁾, y resaltando el papel de la dieta como vehículo para cubrir las necesidades de nutrientes en las personas mayores.

En relación a los lípidos, aunque su ingesta está por encima de los valores recomendados en ambos grupos, las diferencias observadas en el perfil lipídico vienen determinadas por el consumo de aceite de oliva,

superior en los adultos de mediana edad ($1,8 \pm 7,0$ vs. $24,5 \pm 11,7$ g/d). Estas diferencias pueden tener repercusión sobre la salud, dadas las evidencias científicas que relacionan este alimento, esencial en el contexto de una dieta mediterránea, con la protección frente a patologías crónicas características de las sociedades desarrolladas ⁽¹⁸¹⁾. En la base del efecto beneficioso de los AGM se encuentra su papel en el balance del perfil lípido sanguíneo, disminuyendo los niveles de LDL a favor de un incremento en HDL. En este sentido, cabe destacar que, aunque los sujetos de edad avanzada presentaron mayores niveles de LDL y menores de HDL, en comparación con los adultos de mediana edad, las concentraciones de ambas lipoproteínas se encuentran dentro del rango de normalidad para este grupo de población.

En el grupo de sujetos de edad avanzada predomina el consumo de aceite de girasol (80% de los aceites y grasas consumidas), lo que puede explicar, asimismo, su elevada ingesta de AGP. Además, puesto que los aceites de semillas son una de las principales fuentes dietéticas de vitamina E, la mayor presencia de este alimento en la dieta de los sujetos de edad avanzada podría explicar las diferencias en la ingesta de este micronutriente. Sin embargo, cabe destacar que, en torno al 75% de los sujetos de este grupo no alcanza la recomendación establecida, por lo que, teniendo en cuenta la importancia de la vitamina E a nivel antioxidante y para el correcto funcionamiento del sistema inmune ⁽¹²⁾, estos resultados podrían tener especial importancia en este colectivo.

2. Pacientes de alergia y sujetos control

En este trabajo no se han encontrado diferencias destacables en la dieta de los pacientes de alergia en comparación con sus controles. Solamente se ha encontrado una menor ingesta de AGM en los alérgicos, asociada a un menor consumo de aceite de oliva ($17,6 \pm 5,8$ g/d en alérgicos vs. $26,7 \pm 15,2$ g/d en los controles, datos no presentados), así como un menor aporte de lignanos, aunque este resultado parece poco relevante dado que se trata de un compuesto con escasa presencia en la dieta, de manera que estas diferencias no parecen afectar a la ingesta total de polifenoles.

Cabe destacar que, en general, el estado nutricional global de estos pacientes es adecuado. Solamente se ha detectado un consumo inferior a las recomendaciones de vitamina D y E. Como se ha comentado anteriormente, la deficiencia de vitamina D en la dieta es frecuente, pero, en condiciones normales, las necesidades de esta vitamina se cubren a través de la síntesis endógena, por lo que estos resultados, *a priori*, no son especialmente relevantes. En relación a la vitamina E, su importancia para este grupo de población radica en su actividad antioxidante, siendo necesaria para el correcto funcionamiento del sistema inmune ⁽¹²⁾. Sin embargo, el bajo consumo en la muestra de una de sus principales fuentes, el aceite de girasol ($2,1 \pm 6,5$ g/d en alérgicos y $1,0 \pm 3,9$ g/d en controles, datos no presentados), podría ser el responsable de la escasa ingesta de esta vitamina.

El consumo de frutas y verduras, principales fuentes de antioxidantes en la dieta, se ha asociado con un efecto beneficioso sobre el curso de la alergia ⁽¹⁸²⁾, ya que el estrés oxidativo es uno de los factores que más

contribuye a la patogénesis de esta enfermedad ⁽¹⁸³⁾. En este sentido, aunque se identificó una ingesta de verduras y hortalizas más baja en el grupo de alérgicos, en comparación con sus controles, al valorar conjuntamente la ingesta de frutas, verduras y hortalizas, encontramos que los valores medios están por encima de los 400 g/d recomendados por la OMS ⁽¹⁷³⁾. Además, las diferencias observadas no parecen comprometer la ingesta de vitaminas, minerales y otros componentes relevantes, como la fibra y los polifenoles, ya que el consumo fue similar en ambos grupos.

3. Pacientes de lupus eritematoso sistémico y sujetos control

El lupus eritematoso sistémico es una patología con un elevado número de comorbilidades asociadas como consecuencia directa de la enfermedad, así como derivadas de su tratamiento farmacológico, siendo, por ello, factible que la presencia de esta enfermedad pueda dar lugar a cambios en los hábitos alimentarios, comprometiendo el aporte de energía y nutrientes. Al evaluar la dieta de los pacientes de LES y compararla con sus controles, solamente encontramos una menor ingesta de estilbenos, diferencia que podría venir mediada a través del consumo más bajo de una de sus principales fuentes, el vino tinto ($6,8 \pm 14,4$ ml/d en LES vs. $34,2 \pm 52,3$ ml/d en controles, datos no presentados). Sin embargo, es necesario considerar que el aporte de los estilbenos al total de polifenoles fue escaso como para encontrar diferencias en la ingesta total de estos compuestos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la presencia de esta enfermedad no parece condicionar la elección de alimentos y, como consecuencia, el estado nutricional global de estos sujetos es adecuado.

Solamente cabe mencionar que, en torno al 45% de los pacientes de LES no alcanzó la recomendación de vitamina D, lo que podría ser relevante para este colectivo dado que los niveles plasmáticos de esta vitamina pueden verse comprometidos como consecuencia de la fisiopatología de la enfermedad, siendo asociada esta tendencia con una mayor severidad de la misma ⁽¹⁸⁴⁾.

Dado que la presencia de LES se asocia con un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular, como consecuencia de la elevada inflamación característica de la enfermedad así como la presencia habitual de dislipemias, diabetes mellitus, síndrome metabólico y obesidad ⁽¹⁴⁹⁾, es de especial importancia para este grupo de población asegurar un consumo adecuado de lípidos. En este sentido, aunque la ingesta de lípidos totales, AGS y AGP fue ligeramente superior a lo que se recomienda, como es habitual en las sociedades desarrolladas, este aspecto no parece condicionar el perfil lipídico sanguíneo, con niveles adecuados en todos los parámetros evaluados.

RELACIÓN ENTRE LA DIETA Y LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se evalúa la asociación entre la dieta habitual y la composición de la microbiota intestinal, en distintos grupos de población. A lo largo de los últimos años han ido aumentando las evidencias científicas que resaltan la importancia de este complejo ecosistema para el organismo y, con ello, las estrategias dietéticas dirigidas a modular su composición, con el objetivo de influir sobre la salud del hospedador. A este nivel, mientras el efecto de la

suplementación con pro y prebióticos ha sido ampliamente estudiado, el papel de la dieta habitual ha recibido poca atención hasta la fecha. En este sentido, los resultados de este trabajo podrían ofrecer algunas ventajas respecto a los estudios de intervención, ya que algunos componentes presentes en los alimentos, como la fibra y los polifenoles, podrían interactuar entre sí, de manera que su efecto fisiológico se modifique cuando éstos son extraídos del alimento que los contiene. Además, los alimentos contienen otros compuestos que podrían afectar a la composición de la microbiota intestinal y que no son tenidos en cuenta en los trabajos de suplementación.

1. Adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada

La asociación inversa encontrada entre flavanonas y pectinas procedentes del consumo de naranja y los niveles de *B. coccooides* y *C. leptum* es contraria a lo esperable, según los trabajos presentes en la literatura, ya que la pectina evade la degradación por las enzimas digestivas humanas y llega al colon, donde es metabolizada por algunos grupos bacterianos, como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Lactobacillus*, favoreciendo su crecimiento ⁽⁷⁹⁾. Una de las hipótesis propuestas para explicar este resultado es que parte de este efecto de la pectina podría ser debido a su interacción con otros componentes presentes en el mismo alimento ⁽¹⁰³⁾, como son las flavanonas. Además de ser una subclase de polifenoles con baja biodisponibilidad ⁽¹⁸⁵⁾, se ha sugerido que el procesamiento de una de sus principales fuentes, los cítricos, puede conducir a la precipitación de estos polifenoles en combinación con pectinas y otras macromoléculas ⁽¹⁸⁶⁾, reduciendo aún más

su capacidad para ser absorbidas a lo largo del intestino delgado ⁽¹⁸⁷⁾, y favoreciendo que puedan llegar al colon en tándem con la fibra dietética. De acuerdo con esto, se encontró que la ingesta de pectinas y flavanonas en este grupo estaba altamente correlacionada ($r = 0,734$, datos no presentados) y se identificó a la naranja como la principal responsable de la presencia de ambos compuestos en la dieta de los participantes, aportando, aproximadamente, un 45% y un 69% de las pectinas y flavanonas totales, respectivamente. La inclusión de ambos compuestos juntos en un modelo de regresión lineal reveló que sólo la ingesta de flavanonas persistía como predictor de los niveles de *C. leptum*. Por lo tanto, parece plausible que la asociación inversa encontrada entre las pectinas y la microbiota pueda, en realidad, ser debida a la interacción de estas fibras y las flavanonas. Aunque no hemos encontrado trabajos que apoyen esta asociación entre el consumo de flavanonas y estos grupos bacterianos, evidencias procedentes de ensayos *in vitro* han demostrado la actividad antimicrobiana de algunas flavanonas y sus metabolitos ^(188;189), sugiriendo que ésta podría estar involucrada en la relación inversa encontrada entre estos flavonoides y los niveles de *B. coccoides* y *C. leptum*.

En términos de consumo de alimentos, probablemente el hallazgo más novedoso sea la asociación positiva encontrada entre el consumo de pan blanco y los niveles de *Lactobacillus*, género bacteriano que, junto con *Bifidobacterium*, ha sido tradicionalmente considerado diana para la acción de los prebióticos, y con efectos beneficiosos para el hospedador atribuidos a algunas de sus cepas ⁽¹⁹⁰⁾. Hasta la fecha, el efecto prebiótico de los cereales ha sido habitualmente asociado a los alimentos integrales ^(191;192), debido a su

alto contenido en fibra. Sin embargo, nuestros resultados revelaron que el consumo de cereales refinados podría modular beneficiosamente la microbiota intestinal, en consonancia con los datos publicados por otros autores ⁽¹⁹³⁾, lo que podría ser de gran interés dado que éstos son el tipo de cereales más consumido en las sociedades occidentales (el consumo de pan blanco en nuestra muestra fue $105,68 \pm 117,06$ g/d). El efecto prebiótico de este alimento podría explicarse por su contenido en hemicelulosas (que representan en torno al 25,8 % de la ingesta total de esta fibra en la muestra), como los arabinosilanos, que se ha visto que podrían modular el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas ^(194;195). Otros componentes presentes en el pan blanco también podrían estar participando en esta asociación, como el almidón resistente, cuya ingesta se encontró directamente asociada con los niveles de *Lactobacillus*. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la determinación de la cantidad de este compuesto en los alimentos es difícil ya que, además de no haber un método aceptado y validado, su contenido en los alimentos depende de diversos factores que, en la actualidad, no están bien estandarizados, como es la variabilidad en la estructura físico-química y en el procesado de sus fuentes alimentarias, así como variables relacionadas con el propio consumidor, como es la distinta masticación ⁽¹⁵⁹⁾. No obstante, la ingesta de almidón resistente se ha determinado a partir de las tablas publicadas por Roberts *et al.*, que recogen el contenido en esta fibra de 52 alimentos de consumo habitual, a partir de los datos procedentes de 8 publicaciones científicas ⁽¹⁵⁹⁾. Resulta llamativa la asociación encontrada entre la ingesta de almidón resistente de la pasta y los niveles de *B. coecoides*, ya que la cantidad de este alimento que se consume en la muestra es baja ($9,6 \pm 7,9$ g/d). Estos resultados podrían deberse al alto contenido de

almidón resistente en la pasta, siendo una de sus principales fuentes en los países donde este alimento presenta un mayor consumo ⁽¹⁹⁶⁾, sumado a la elevada fermentabilidad que presenta este compuesto, y que podría sustentar la base de su efecto prebiótico ampliamente estudiado ^(76;77).

La ausencia de asociación entre la ingesta de polifenoles y fibras y los niveles fecales de otros microorganismos, como *Bacteroides* o *Bifidobacterium*, no está de acuerdo con los resultados previos de algunos estudios de intervención ^(197;198). En este punto, es necesario considerar que la ingesta de polifenoles en nuestra muestra podría ser insuficiente para ejercer impacto sobre algunos grupos microbianos, al igual que ocurre con la fibra dietética, con un 47,4% de los sujetos que no alcanzan la recomendación de consumir 16-24 g/d de polisacáridos no almidonáceos ⁽⁶¹⁾. A ello hay que sumar la escasa variabilidad en la ingesta de estos compuestos que, junto con el reducido tamaño de la muestra, podría limitar el poder estadístico de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por último, la ausencia de asociación entre estos componentes de la dieta y la microbiota en ancianos (resultados no presentados) podría ser debida a la diferente composición de la microbiota, ya que se ha encontrado que este grupo de edad presenta menores niveles de *Bacteroides*, *Blautia coccooides* y *Faecalibacterium* y mayores de *Lactobacillus* (Publicación 1), o al hecho de que la ingesta de fibras y polifenoles en este grupo, alejada de las cantidades suministradas en otros trabajos en este campo ^(121;193), no alcance la concentración mínima necesaria para tener un impacto sobre la microbiota intestinal.

2. Pacientes de alergia y sujetos control

Los resultados encontrados en pacientes de alergia apuntan a que la relación entre los polifenoles de la dieta y la microbiota intestinal podría ser específica para cada compuesto y grupo microbiano evaluado, dado que sólo ciertos géneros han sido asociados con la ingesta de algunos polifenoles, y que estas asociaciones no se observaron en los sujetos control. Aunque una posible explicación podría ser la existencia de diferencias en la ingesta de polifenoles, como se ha comentado previamente, solamente se encontró un menor consumo de lignanos en el grupo de alérgicos, compuestos que, además de presentar una baja contribución a la ingesta total de polifenoles, no mostraron ninguna asociación con la microbiota. Por lo tanto, parece más probable que la variabilidad inter-grupal en la composición de la microbiota intestinal (resultados no publicados) pueda explicar las distintas asociaciones encontradas en sujetos alérgicos respecto a los controles ⁽¹⁹⁹⁾.

Aunque la ingesta de café en nuestra muestra es baja, en comparación con otros países europeos (61 ml/d vs. 270 ml/d) ⁽²⁰⁰⁾, nuestros resultados señalan una asociación positiva entre el consumo de esta bebida y la abundancia de *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. A pesar de que no están bien documentados los beneficios que puede suponer la presencia de mayores niveles de estos grupos microbianos en los pacientes de alergia, estudios llevados a cabo con modelos animales han propuesto que la administración de algunas de estas bacterias es capaz de modular la respuesta alérgica, a través de la regulación de la respuesta de las células T ⁽²⁰¹⁾. Además la administración oral de una mezcla de varias cepas de *Clostridium*

se vio que atenuaba la sintomatología en un modelo murino de diarrea alérgica, mediante la activación de las células T reguladoras⁽²⁰²⁾.

El efecto del café sobre la microbiota intestinal aún no está del todo claro. Resultados procedentes de un modelo animal indican que esta bebida podría limitar el crecimiento de algunos grupos bacterianos como *Clostridium* y *E. coli* y, al mismo tiempo, favorecer el crecimiento de otros como *Bifidobacterium*⁽²⁰³⁾. Este aumento en las poblaciones de *Bifidobacterium* tras la suplementación con café también ha sido encontrado en humanos, en consonancia con nuestros resultados⁽²⁰⁴⁾. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la naturaleza de nuestro estudio no nos permite profundizar en el impacto de factores que podrían afectar al contenido de polifenoles de esta bebida, como es la variedad del grano, su grado de tostado y otros factores relacionados con su procesado⁽²⁰⁵⁾.

Además de las propiedades antioxidantes⁽²⁰⁶⁾, antiinflamatorias⁽²⁰⁷⁾ y antialérgicas⁽²⁰⁸⁾ descritas para los polifenoles del vino tinto, la asociación positiva entre el consumo de esta bebida y la abundancia de *Bacteroides* apoya el papel de este alimento rico en polifenoles en la modulación de la microbiota intestinal, de acuerdo con los resultados publicados por otros autores⁽¹²¹⁾. La importancia de este grupo bacteriano para los pacientes de alergia no está del todo clara, sin embargo, los mayores niveles de este género encontrados en niños con síntomas de alergia sugieren que éste podría jugar un papel importante en el desarrollo de esta patología en edades tempranas⁽²⁰⁹⁾.

3. Pacientes de lupus eritematoso sistémico y sujetos control

Aunque el lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica de naturaleza autoinmune, su causa es aún desconocida. Evidencias científicas recientes apuntan a que la composición de la microbiota intestinal podría modular la sintomatología y progresión de la enfermedad ⁽¹⁵³⁾. Aunque, por el momento, se desconoce el impacto que podría suponer la corrección del desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal en estos pacientes, la identificación de los factores dietéticos capaces de modularlo podría ser de gran importancia para futuras investigaciones en este campo.

La asociación positiva encontrada, en estos pacientes, entre el consumo de flavanonas de la naranja y la abundancia de *Lactobacillus* podría ser relevante para este colectivo, dado que la administración de estos microorganismos a un modelo murino de LES dio lugar a una menor progresión de la enfermedad ⁽²¹⁰⁾. No obstante, la información acerca del papel de los polifenoles individuales sobre la microbiota es limitada, lo que dificulta la comparación de nuestros resultados, teniendo en cuenta que los datos procedentes de estudios *in vitro* no son directamente extrapolables a lo que ocurre en un contexto fisiológico.

La ingesta de dihidrocalconas procedentes del consumo de manzana se asoció directamente con la abundancia relativa de *Bifidobacterium*, resultado que podría ser debido a que estos flavonoides, junto con las fibras presentes en este alimento, son degradados por este grupo microbiano, favoreciendo su crecimiento. Este efecto prebiótico de los polifenoles de la

manzana ha sido previamente sugerido en trabajos llevados a cabo tanto en animales como en humanos ^(79;211), y podría de especial interés para los pacientes de LES, dado el efecto inmunomodulador atribuido a algunas cepas de *Bifidobacterium* ⁽²¹²⁾, tales como *B. bifidum* LMG13195, que estimula la activación de las células T reguladores, que, mediante la expresión de receptores de citocinas, favorecen la homeostasis de la mucosa ^(213;214).

Aunque las flavonas se encuentran ampliamente distribuidas entre las frutas y verduras consumidas en la muestra (naranja, lechuga, sandía, kiwi, tomate, manzana, etc.) ninguna de sus fuentes fue identificada como predictor de la abundancia de *Blautia*, lo que nos lleva a plantear que la asociación encontrada podría ser debida a la combinación de todos estos alimentos presentes en la dieta de los participantes. Las flavanonas y dihidrocalconas, por el contrario, son proporcionas, casi exclusivamente, por el consumo de naranja y manzana, respectivamente. Dado que la activación de las células T reguladoras dependiente de *Clostridium* parece ser necesaria para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune, y teniendo en cuenta que *Blautia* pertenece al clúster *Clostridium XIVa*, que favorece la acumulación de células T reguladoras, este resultado también podría ser de gran interés para futuras investigaciones en el campo de las enfermedades autoinmunes ⁽²⁰²⁾.

Resultados previos procedentes de estudios de intervención con dietas ricas en lípidos han sugerido que la ingesta excesiva de estos macronutrientes en la dieta puede conducir a cambios sustanciales en la composición de la microbiota intestinal ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan estos datos. Tampoco encontramos asociación entre el

consumo de proteínas de origen animal y fibra dietética y la composición de la microbiota intestinal, por lo que, es posible, que las cantidades consumidas en la muestra, en el contexto de una dieta equilibrada, sean insuficientes para ejercer un impacto sobre la microbiota intestinal o, como ya se ha comentado previamente, que la combinación de los distintos alimentos en la dieta habitual pueda modificar el efecto de un componente individual. En este sentido, se ha sugerido que el efecto que ejercen las dietas ricas en lípidos podría verse modulado cuando estos macronutrientes son administrados junto con zumo de naranja ⁽²¹⁵⁾, probablemente debido a la alta concentración de polifenoles en este alimento y a su efecto modulador de la microbiota intestinal.

Es destacable que las asociaciones encontradas en pacientes de LES no se manifestaron en los controles, por lo que, además de la variabilidad inter-grupal en la composición de la microbiota intestinal, es posible que los individuos con un sistema inmune equilibrado sean menos susceptibles al efecto de la dieta que los sujetos con una respuesta inmune alterada. En el grupo de sujetos control se encontró una asociación positiva entre el consumo de dihidroflavonoles del vino tinto y la abundancia relativa de *Faecalibacterium*, género dentro del que se encuentra *Faecalibacterium prausnitzii*, grupo bacteriano que hoy día está recibiendo mucho interés por su papel en la protección frente a algunas patologías intestinales de base inflamatoria ⁽²¹⁶⁾. Aunque el efecto del vino tinto sobre este grupo bacteriano no ha sido descrito hasta la fecha, este resultado está en consonancia con los cambios, observados por otros autores, en bacterias pertenecientes al filo Firmicutes tras la suplementación con esta bebida ⁽¹²¹⁾, y apoya la hipótesis

que le atribuye un efecto prebiótico ⁽²¹⁷⁾. Es posible que la ausencia de asociación en pacientes de LES pueda ser debida a la baja ingesta de vino tinto en este grupo en comparación con los controles, con, aproximadamente, un 80% de la muestra que no consumía esta bebida. Por otro lado, la asociación inversa, encontrada en el grupo de controles, entre la ingesta de flavonoles y la abundancia relativa de *Bifidobacterium* está de acuerdo con resultados previos procedentes de ensayos *in vitro* ⁽¹¹³⁾.

Las distintas asociaciones encontradas en cada uno de los grupos de población estudiados en la presente Tesis Doctoral podrían ser consecuencia de diferencias en la dieta de cada uno de ellos. En este sentido, además de la distinta procedencia de las fibras y polifenoles, la cantidad consumida de estos compuestos también podría jugar un papel importante. Así lo sugieren las asociaciones contrarias encontradas entre el consumo de flavanonas procedentes de la naranja y la microbiota, ya que, mientras en pacientes de LES la ingesta de estos flavonoides es moderada ($38,2 \pm 29,4$ mg/d), los adultos de mediana edad presentan un consumo superior al resto de grupos evaluados ($157,1 \pm 169,7$ mg/d) (datos no presentados), lo que podría explicar la asociación negativa encontrada, en consonancia con resultados *in vitro* que apoyan que el efecto antibacteriano de las flavanonas sobre la microbiota intestinal es dosis-dependiente ⁽¹¹³⁾. Sin embargo, la ausencia de diferencias inter-grupales en el consumo de otros componentes dietéticos asociados con la microbiota en este trabajo, corroboran las evidencias previas que sugieren que en esta relación intervienen otros factores, como son la composición microbiana y factores relacionados con el estado fisiológico de los sujetos, y ponen de manifiesto su enorme complejidad. Por lo tanto, estos

resultados resaltan la importancia de evaluar esta asociación en distintos grupos de población de cara a la creación de estrategias de intervención o al diseño de nuevos alimentos funcionales específicos para las necesidades de cada colectivo.

En este punto, es necesario destacar que las tablas de composición de alimentos, en muchos casos, no tienen en cuenta factores que pueden modular la cantidad de fibra y polifenoles, como son la variedad de la planta, el grado de madurez o factores relacionados con el almacenamiento, procesado y cocinado, y que, por lo tanto, no son tenidos en cuenta en los estudios nutricionales. Además, los polifenoles son compuestos sujetos a una elevada variabilidad en su biodisponibilidad, modulada por factores tales como la matriz de los alimentos, el procesamiento o el metabolismo microbiano.

Por último, aunque la composición de la microbiota intestinal es variable a lo largo del tracto gastrointestinal, las muestras fecales se consideran representativas del contenido del colon, principalmente de la parte distal. Este aspecto, junto con su accesibilidad y disponibilidad, hace que las muestras fecales sean el material utilizado en la mayoría de los trabajos en humanos, y que, por lo tanto, la mayor parte de la información disponible, en la actualidad, sobre la microbiota humana sea procedente de este tipo de muestras.

RELACIÓN ENTRE LA DIETA Y LAS CONCENTRACIONES FECALES DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

1. Adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada

Los AGCC han sido identificados como compuestos capaces de ejercer efectos beneficiosos para la salud del hospedador, por lo que la asociación encontrada, en este trabajo, entre la ingesta de fibras procedentes de la manzana y la patata, y los niveles fecales de estos metabolitos en personas de edad avanzada, podrían ser de gran relevancia para el futuro diseño de estrategias dietéticas dirigidas a modular la síntesis de estos compuestos con el fin de optimizar el estado de salud en el envejecimiento.

Algunos autores han sugerido que los sujetos con una baja producción de AGCC podrían presentar una mayor respuesta al efecto de la ingesta de fibra sobre esta actividad metabólica, en comparación con aquellos sujetos cuyos niveles basales son mayores ⁽¹⁰²⁾. En este sentido, los sujetos de edad avanzada evaluados en este estudio, con menores niveles fecales de AGCC que los adultos de mediana edad (Publicación 1), podrían constituir un grupo de población altamente sensible al efecto de la dieta.

La asociación directa encontrada entre el consumo de patata y los niveles fecales de acetato, propionato y butirato está en consonancia con los resultados procedentes de ensayos de fermentabilidad *in vitro* ⁽¹⁰⁵⁾. Es necesario puntualizar que, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que describe el impacto del consumo de patata y celulosa sobre los niveles de AGCC en una muestra de personas de edad avanzada, no

encontrando resultados en la misma línea con los que poder comparar nuestros datos. Dado que la patata proporciona, simultáneamente, hemicelulosa, pectina y celulosa, nos planteamos que esta última fibra podría explicar parte de la asociación encontrada entre el consumo de este tubérculo y los niveles de AGCC. Aunque se trata de una fibra con escasa fermentabilidad, la elevada ingesta en la muestra, en comparación con el resto de fibras (aporta aproximadamente el 34% de la fibra total), podría ser la causa que explique esta asociación. Además, resultados procedentes de un trabajo de suplementación llevado a cabo en cerdos apoyan el papel de la celulosa en la producción de AGCC ⁽²¹⁸⁾. Por otra parte, el consumo de patata mostró una relación, aparentemente independiente, con los niveles de AGCC, sugiriendo que otros compuestos presentes en este alimento podrían ser responsables de esta asociación, como el almidón resistente, cuyo impacto sobre la producción de AGCC ha sido ampliamente estudiado ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. Sin embargo, como ya se ha comentado, se trata de una fibra cuyo contenido en los alimentos depende de factores difícilmente cuantificables, pudiendo ser este el motivo por el que no se encontró ninguna asociación entre la ingesta de este componente y los niveles de AGCC en nuestra muestra (datos no presentados).

El contenido en pectina de la manzana podría ser el responsable de la asociación encontrada entre el consumo de esta fruta y los niveles fecales de propionato. Sin embargo, se trata de una modesta asociación que podría ser explicada por varios motivos: en primer lugar, la baja cantidad de fibra insoluble que aportan las manzanas (1,88g/100g de alimento) no es comparable a las cantidades suministradas en estudios de suplementación; en

segundo lugar, la mayor parte de los sujetos de edad avanzada consumían la manzana sin piel, reduciendo, aún más, la ingesta de fibra insoluble; y, por último, es posible que la elevada correlación entre las diferentes fuentes de fibra en la muestra pueda modificar la identificación de una asociación individual para la mayoría de los alimentos.

Finalmente, cabe mencionar que aunque la determinación de la concentración de AGCC fecales no es una medición directa de la concentración en el colon, ya que la cantidad excretada supone sólo el 5-10% de la producción total que no es absorbida en la mucosa ⁽⁸⁵⁾, es la medida más frecuentemente utilizada en estudios en humanos, dada su accesibilidad y disponibilidad.

RELACIÓN DE LA DIETA CON MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS.

1. Relación entre la dieta y marcadores de estrés oxidativo en adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada.

El consumo moderado de vino tinto ha sido asociado con diversos efectos beneficiosos para la salud que, en parte, han sido atribuidos a su contenido en antioxidantes ⁽²⁴⁾. Aunque el consumo de esta bebida en la muestra de sujetos de mediana edad contribuyó a una mayor ingesta de flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenos, ésta no fue suficiente como para mostrar diferencias significativas en la ingesta total de polifenoles entre los consumidores y no consumidores de vino tinto. En consecuencia, tampoco se encontraron diferencias en los niveles séricos de la capacidad antioxidante total (CAT) entre ambos grupos, resultados que difieren de los publicados en

trabajos previos^(206;219;220). Sin embargo, a la hora de interpretar estos datos es necesario tener en cuenta algunos aspectos importantes: el consumo medio de vino tinto en nuestro estudio (100,07 ml/d) está muy por debajo de los 375-400 ml/d administrados en estudios de suplementación; además es posible que la suplementación con estas dosis elevadas de vino tinto durante periodos cortos de tiempo (2-4 semanas) pueda ejercer efectos distintos a los ocasionados por un consumo moderado y regular de esta bebida; asimismo, es probable que la alta variabilidad en el consumo de esta bebida en nuestra muestra pueda dar lugar a diferentes efectos entre sujetos; y, por último, es de especial importancia el papel del resto de polifenoles de la dieta, ya que la cantidad proporcionada por otros alimentos, como frutas y verduras, podría contrarrestar las diferencias en la ingesta total de polifenoles entre los consumidores y no consumidores de vino tinto. También es necesario tener en cuenta que existen factores que pueden modular el contenido en polifenoles del vino tinto, como es la variedad de la uva, el tipo de cultivo, su procesamiento o la edad⁽²²¹⁾, y que no ha sido posible valorar en este estudio.

Nuestros resultados revelaron que el consumo regular de vino tinto está asociado con menores niveles séricos de MDA. Aunque un único marcador no es suficiente para aludir a estrés oxidativo, el MDA es uno de los productos de lipoperoxidación más abundantes, tanto procedente de los alimentos como sintetizado endógenamente, y, probablemente, el marcador de peroxidación lipídica más ampliamente utilizado en estudios en humanos^(222;223). No hay consenso en la literatura acerca de la utilidad del MDA para la predicción del riesgo de mortalidad, sin embargo, la comparación de nuestros datos con los resultados de trabajos previos, reveló que los niveles de este

marcador en los consumidores de vino tinto eran similares a los encontrados en sujetos con un riesgo bajo de mortalidad ⁽¹⁷⁹⁾.

El consumo de moderado de vino tinto también ha sido asociado con un efecto protector frente a la inflamación ⁽²⁰⁷⁾, sin embargo, en este trabajo no hemos encontrado diferencias significativas en las concentraciones séricas de proteína C reactiva (PCR) entre los consumidores y no consumidores de esta bebida. Aunque la PCR ha sido identificada como un predictor de enfermedad cardiovascular, los niveles encontrados en nuestra muestra se encuentran dentro del rango considerado como riesgo bajo de esta patología (0,11-0,55 mg/dl) ⁽²²⁴⁾.

Evidencias científicas recientes sugieren que la microbiota intestinal podría ser responsable, en parte, de los efectos beneficiosos descritos para los polifenoles del vino tinto, ya que algunos grupos microbianos pueden transformar estos compuestos, generando metabolitos con una mayor biodisponibilidad y bioactividad que sus predecesores ⁽¹¹¹⁾. Algunos autores han comparado a la microbiota intestinal con una huella dactilar, de manera que su composición es única para cada individuo y puede estar modulada por los hábitos alimentarios a largo plazo ⁽¹³⁵⁾. En este contexto, se encontró que los consumidores habituales de vino tinto presentaban una composición microbiana distinta a la de los no consumidores, con menores niveles de *Blautia coccooides*, *Clostridium leptum*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en consonancia con la actividad antibacteriana atribuida a algunos polifenoles del vino tinto ^(197;198;217). Es posible que la susceptibilidad de los distintos grupos microbianos al efecto antibacteriano de estos compuestos pueda ser

determinado por la estructura de la pared, siendo los Gram-positivos más sensibles a este efecto que los Gram-negativos ⁽²²⁵⁾. Esto podría explicar la ausencia de diferencias en los niveles de *Akkermansia*, *Bacteroides* y *F. prausnitzii*, aunque también es posible que estos grupos microbianos puedan beneficiarse de la actividad antioxidante de los polifenoles del vino tinto.

2. Relación entre la dieta y parámetros inmunológicos en adultos de mediana edad y sujetos de edad avanzada.

Durante el envejecimiento tienen lugar cambios en el sistema inmune, tales como fallos en la actividad fagocítica de monocitos/macrófagos y descenso en la actividad citotóxica de las células NK ⁽¹²⁹⁾, que, sumado a la desregulación de las respuestas adaptativas, incrementan el estado inflamatorio sistémico y aumentan la susceptibilidad a la enfermedad en edades avanzadas ⁽¹³³⁾. Puesto que la nutrición ocupa un lugar importante en el correcto funcionamiento del sistema inmune, el diseño de estrategias dietéticas dirigidas a contrarrestar estos cambios que tienen lugar en el envejecimiento podría ser de gran importancia a la hora de mejorar la calidad de vida de este colectivo. En este sentido, los resultados presentados en este trabajo han permitido identificar, por primera vez en personas de edad avanzada, una asociación positiva entre la ingesta de AGM y las citocinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α , mientras que, por el contrario, el consumo de AGP se encontró negativamente asociado con la concentración de IL-12. Asimismo, la ingesta de vitamina C en este grupo de edad se encontró inversamente asociada con los niveles de estos mediadores pro-inflamatorios y positivamente con la actividad citotóxica de las células NK.

Estas asociaciones no fueron confirmadas en los adultos de mediana edad, a pesar de que este grupo presenta una mayor ingesta de AGM y vitamina C, lo que sugiere que, o bien hay un nivel umbral para el efecto de estos nutrientes sobre el sistema inmune, o bien existen otros factores relacionados con la senescencia que pueden estar interviniendo en las asociaciones encontradas. Se sabe que la malnutrición conlleva el deterioro de las respuestas inmunes y, por lo tanto, puede ser un importante factor de confusión en estudios que evalúan el efecto de la edad sobre el sistema inmune ⁽²²⁶⁾. Sin embargo, nuestra muestra de personas de edad avanzada presentó una ingesta energético-proteica adecuada, comparable a la del grupo de adultos de mediana edad. Por lo tanto, el distinto comportamiento observado entre ambos grupos parece estar asociado con la edad, más que con el estado nutricional.

La asociación positiva encontrada entre la ingesta de AGM y las citocinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α nos lleva a pensar que estos ácidos grasos no son tan inmunológicamente neutros como tradicionalmente se ha creído, sino que su consumo podría favorecer el estado inflamatorio en el envejecimiento. Si bien estos resultados difieren de los procedentes de trabajos previos en los que dietas ricas en AGM se asociaron con la supresión de las respuestas inflamatorias ^(227;228), es necesario tener en cuenta que las elevadas cantidades suministradas en estos estudios, no son comparables con la ingesta de nuestra muestra, lo que podría condicionar las asociaciones observadas ⁽²²⁷⁾. Por lo tanto, aunque son necesarios más estudios encaminados a esclarecer el papel de estos lípidos sobre el sistema inmune, lo que sí parece estar claro es que su uso como placebo debería ser cuestionado.

Por otro lado, la asociación negativa encontrada entre la ingesta de esta vitamina y los niveles de IL-12 y TNF- α está de acuerdo con trabajos previos que apoyan el papel de esta vitamina en el control de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, y que sugieren que el mecanismo de actuación podría ser llevado a cabo a través de su actividad antioxidante, inhibiendo la transcripción del factor NF- κ B y regulando a la baja la síntesis de estos marcadores pro-inflamatorios ⁽¹⁴⁾. El hallazgo de esta asociación entre la vitamina C y la actividad de las células NK está en consonancia con los resultados procedentes de trabajos previos, que sugieren que este efecto podría ser llevado a cabo a través de la activación de la proteína quinasa C ⁽¹⁵⁾. Esta asociación podría ser gran de interés, dado que la actividad de las células NK es indispensable para proteger al organismo frente a la infección, en especial en personas de edad avanzada, frecuentemente expuestas a agentes infecciosos. Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a que un consumo adecuado de vitamina C, en el contexto de una dieta normal, podría ser beneficioso para contrarrestar el incremento en la inflamación, así como mejorar la respuesta inmune frente a la infección en edades avanzadas.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto, por primera vez, la existencia de una asociación entre la dieta habitual en humanos y la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal, así como con marcadores de estrés oxidativo y parámetros inmunológicos, siendo esta relación variable en función del grupo de población en estudio.

1. El estado nutricional de la muestra es adecuado de manera global, solamente se ha encontrado una ingesta moderadamente inferior a las recomendaciones de AGM, ácido fólico, vitamina A, D y E en ancianos, y estas dos últimas vitaminas en pacientes de alergia y LES.

2. Existen asociaciones entre la ingesta de algunas fibras y compuestos de naturaleza fenólica, procedentes de alimentos de consumo habitual, y la composición y actividad de la microbiota intestinal, siendo éstas diferentes en función del grupo de población evaluado, lo que apoya las evidencias previas que sugieren que en la asociación de la dieta y este ecosistema participan otros factores, como la propia composición microbiana y factores relacionados con el estado fisiológico del sujeto.

- Parece plausible que las flavanonas y pectinas, procedentes del consumo de naranja en adultos de mediana edad, interaccionan entre sí en la modulación de las poblaciones de *Blautia cocccoides* y *Clostridium leptum*, de manera que la posible actividad antimicrobiana *in vitro* de estos flavonoides podría ser la principal responsable de la asociación negativa encontrada. El pan blanco es la principal fuente de cereales de la dieta de estos sujetos y, como tal, las hemicelulosas y almidón resistente contenidos

en este alimento podrían favorecer el crecimiento de grupos probióticos como *Lactobacillus*.

- El consumo de bebidas ricas en polifenoles se asocia con mayores niveles de algunos grupos microbianos en pacientes de alergia, en consonancia con datos previos que apoyan el efecto prebiótico de estos alimentos. De esta manera, el consumo moderado de café, rico en ácidos fenólicos, podría favorecer el crecimiento de *Clostridium*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*, y los estilbenos del vino tinto el de *Bacteroides*. En sujetos sanos, los dihidroflavonoles del vino tinto podrían modular positivamente las poblaciones de *Fecalibacterium*.

- En pacientes de LES, la ingesta de flavanonas y dihidrocalconas procedentes del consumo de naranja y manzana, respectivamente, se asocia con mayores niveles de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, resultados que apoyan la actividad prebiótica atribuida a estas frutas.

- En personas de edad avanzada, la ingesta de celulosa se asocia directamente con los niveles fecales de acetato y butirato, y la pectina insoluble con los de propionato, siendo el consumo de patata y manzana identificado como el principal responsable de esta asociación. La baja fermentabilidad que presentan estas fibras podría ser contrarrestada por la elevada cantidad que se consume en la muestra, en comparación con las fibras solubles, suponiendo, en conjunto, más del 45% de la ingesta de fibra total.

3. Algunos alimentos y nutrientes están relacionados con marcadores de estrés oxidativo y parámetros inmunológicos. Los resultados presentados en este trabajo están de acuerdo con el papel antioxidante del vino tinto,

propuesto anteriormente, y señalan a la microbiota intestinal como una de las posibles responsables que explican dicho efecto. Por otra parte, la asociación encontrada entre la ingesta de AGM y los niveles de citocinas pro-inflamatorias, sugieren que estos nutrientes no son inmunológicamente neutros, sino que podrían exacerbar el estado inflamatorio en el envejecimiento. Por el contrario, la ingesta de vitamina C podría contrarrestar el incremento en los niveles de estos mediadores de inflamación, así como mejorar la respuesta a la infección a través de un incremento en la actividad citotóxica de las células NK.

ANEXOS

Anexo 1 . Principales grupos de alimentos consumidos en la muestra	
Aceites y grasas	Aceite, mantequilla y margarina
Azúcares	Azúcares, miel y jarabes Caramelos Chocolate Mermeladas y confituras Polos y sorbetes Turrone y mazapanes
Bebidas alcohólicas	Aguardientes y licores Cervezas, sidras y vinos
Bebidas no alcohólicas	Café, cacao e infusiones Refrescos Zumos y néctares envasados
Carnes	Aves Vacuno Cerdo Cordero Conejo Embutidos y jamón
Cereales	Cereales de desayuno y galletas Granos y harinas Panadería Pasta Pastelería y bollería
Frutas	Frutas desecadas, frescas y en conserva
Huevos	Huevo de gallina
Lácteos	Leche y batidos lácteos Helados y postres lácteos Quesos Yogures y leches fermentadas
Legumbres	Legumbres secas, frescas y en conserva
Pescados y mariscos	Crustáceos y moluscos frescos y en conserva Pescado magro y graso fresco y en conserva Derivados de pescado y marisco
Verduras y hortalizas	Verduras y hortalizas frescas y en conserva
Patatas	Patatas y derivados de patata

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Underwood, E.A. Lavoisier and the History of Respiration. *Proc R Soc Med.* 1944;37(6):247-62.
- (2) Rosenfeld, L. Justus Liebig and animal chemistry. *Clin Chem.* 2003;49(10):1696-707.
- (3) Erdman, A.M. Cornelis Adrianus Pekelharing: a biographical sketch (July 19, 1848-September 18, 1922). *J Nutr.* 1964;83:3-9.
- (4) Hopkins, F.G. Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries. *J Physiol.* 1912;44(5-6):425-60.
- (5) Piro, A., Tagarelli, G., Lagonia, P. *et al.* Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Ann Nutr Metab.* 2010;57(2):85-8.
- (6) Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases (2002: Geneva, Switzerland).
- (7) Scrimshaw, N.S., Taylor, C.E. & Gordon, J.E. Interactions of nutrition and infection. *Am J Med Sci.* 1959;237(3):367-403.
- (8) Delafuente, J.C. Nutrients and immune responses. *Rheum Dis Clin North Am.* 1991;17(2):203-12.
- (9) Dasgupta, M., Sharkey, J.R. & Wu, G. Inadequate intakes of indispensable amino acids among homebound older adults. *J Nutr Elder.* 2005;24(3):85-99.
- (10) Dawson, H.D. & Ross, A.C. Chronic marginal vitamin A status affects the distribution and function of T cells and natural T cells in aging Lewis rats. *J Nutr.* 1999;129(10):1782-90.
- (11) Aukrust, P., Muller, F., Ueland, T. *et al.* Decreased vitamin A levels in common variable immunodeficiency: vitamin A supplementation in vivo enhances immunoglobulin production and downregulates inflammatory responses. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(3):252-9.
- (12) Beharka, A., Redican, S., Leka, L. & Meydani, S.N. Vitamin E status and immune function. *Methods Enzymol.* 1997;282:247-63.

- (13) Jacob, R.A., Kelley, D.S., Pianalto, F.S. *et al.* Immunocompetence and oxidant defense during ascorbate depletion of healthy men. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(6 Suppl):1302S-9S.
- (14) Schwager, J. & Schulze, J. Modulation of interleukin production by ascorbic acid. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;64(1):45-57.
- (15) Heuser, G. & Vojdani, A. Enhancement of natural killer cell activity and T and B cell function by buffered vitamin C in patients exposed to toxic chemicals: the role of protein kinase-C. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1997;19(3):291-312.
- (16) Lawrence, R.A. & Burk, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;71(4):952-8.
- (17) Wintergerst, E.S., Maggini, S. & Hornig, D.H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab.* 2007;51(4):301-23.
- (18) Maggini, S., Wintergerst, E.S., Beveridge, S. & Hornig D.H. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr.* 2007;98 Suppl 1:S29-S35.
- (19) Hegde, S.V., Adhikari P, M.N. & D'Souza, V. Effect of daily supplementation of fruits on oxidative stress indices and glycaemic status in type 2 diabetes mellitus. *Complement Ther Clin Pract.* 2013;19(2):97-100.
- (20) Holt, E.M., Steffen, L.M., Moran, A. *et al.* Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc.* 2009;109(3):414-21.
- (21) Rink, S.M., Mendola, P., Mumford, S.L. *et al.* Self-report of fruit and vegetable intake that meets the 5 a day recommendation is associated with reduced levels of oxidative stress biomarkers and increased levels of antioxidant defense in premenopausal women. *J Acad Nutr Diet.* 2013;113(6):776-85.
- (22) Dow, C.A., Wertheim, B.C., Patil, B.S. & Thomson, C.A. Daily consumption of grapefruit for 6 weeks reduces urine F2-isoprostanes in overweight adults with high

- baseline values but has no effect on plasma high-sensitivity C-reactive protein or soluble vascular cellular adhesion molecule 1. *J Nutr.* 2013;143(10):1586-92.
- (23) Simao, T.N., Lozovoy, M.A., Simao, A.N. *et al.* Reduced-energy cranberry juice increases folic acid and adiponectin and reduces homocysteine and oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2013;110(10):1885-94.
- (24) Lippi, G., Franchini, M., Favaloro, E.J. & Targher, G. Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(1):59-70.
- (25) Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C. *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993;342(8878):1007-11.
- (26) Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R. *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(3):560-8.
- (27) Scalbert, A., Johnson, I.T. & Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):215S-7S.
- (28) Sies, H., Schewe, T., Heiss, C. & Kelm, M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):304S-12S.
- (29) Duffy, S.J., Keaney, J.F. Jr., Holbrook, M. *et al.* Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104(2):151-6.
- (30) Duffy, S.J., Vita, J.A., Holbrook, M. *et al.* Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(6):1084-9.
- (31) James, M.J., Gibson, R.A. & Cleland, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(1 Suppl):343S-8S.
- (32) Mori, T.A. & Beilin, L.J. Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2004;6(6):461-7.

- (33) Kew, S., Mesa, M.D., Tricon, S. *et al.* Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 2007;79(4):674-81.
- (34) Kaplan, G.J., Fraser, R.I. & Comstock, G.W. Tuberculosis in Alaska, 1970. The continued decline of the tuberculosis epidemic. *Am Rev Respir Dis.* 1972;105(6):920-6.
- (35) Virella, G., Fourspring, K., Hyman, B. *et al.* Immunosuppressive effects of fish oil in normal human volunteers: correlation with the in vitro effects of eicosapentaenoic acid on human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991;61(2 Pt 1):161-76.
- (36) Yaqoob, P., Newsholme, E.A. & Calder, P.C. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett.* 1994;41(2-3):241-7.
- (37) Yaqoob, P. & Calder, P.C. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T cell-derived cytokines. *Cytokine* 1995;7(6):548-53.
- (38) Yaqoob, P., Knapper, J.A., Webb, D.H. *et al.* Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(1):129-35.
- (39) Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D. & Weaver, C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 2012;489(7415):231-41.
- (40) Noverr, M.C. & Huffnagle, G.B. Does the microbiota regulate the immune responses outside the gut? *Trends Microbiol.* 2004;12(12):562-8.
- (41) Metchnikoff, E. The prolongation of life: optimistic studies. New York: Chalmers Mitchell P; 1908.
- (42) Lilly, D.M. & Stillwell, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 1965;147(3659):747-8.
- (43) Parker, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health.* 1974;29:4-8.
- (44) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. (2001: Córdoba, Argentina).

- (45) de Vresse, M. & Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008;111:1-66.
- (46) Johnston, B.C., Ma, S.S., Goldenberg, J.Z. *et al.* Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2012;157(12):878-88.
- (47) Sinagra, E., Tomasello, G., Cappello, F. *et al.* Probiotics, prebiotics and symbiotics in inflammatory bowel diseases: state-of-the-art and new insights. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2013;27(4):919-33.
- (48) Moro-Garcia, M.A., Alonso-Arias, R., Baltadjieva, M. *et al.* Oral supplementation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 8481 enhances systemic immunity in elderly subjects. *Age (Dordr).* 2013;35(4):1311-26.
- (49) Van Puyenbroeck, K. Hens, N., Coenen, S. *et al.* Efficacy of daily intake of *Lactobacillus casei* *Shirota* on respiratory symptoms and influenza vaccination immune response: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy elderly nursing home residents. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(5):1165-71.
- (50) Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 2009;461(7268):1282-6.
- (51) Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E. *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308(5728):1635-8.
- (52) Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 2012;489(7415):220-30.
- (53) De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M. *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(33):14691-6.
- (54) Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J. *et al.* The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 2009;1(6):6ra14.

- (55) Hildebrandt, M.A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S.A. *et al.* High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-24.
- (56) Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
- (57) Hipsley, E.H. Dietary "fibre" and pregnancy toxemia. *Br Med J*. 1953;2(4833):420-2.
- (58) Trowell, H. Editorial: Definitions of fibre. *Lancet*. 1974 Mar 23;1(7856):503.
- (59) Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association Of Cereal Chemists. The Definition of Dietary Fiber. *Cereal Foods World*. 2001; 46(3):112-126.
- (60) Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad). Evaluación Nutricional de la Dieta Española. I Energía y Macronutrientes. Sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). (2012: Madrid, España).
- (61) Nishida, C., Uauy, P. & Kumanyika, S. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and prevention of chronic diseases: process, product and policy. *Publ Health Nutr*. 2004;7(1A):245-50.
- (62) Bijkerk, C.J., Muris, J.W., Knottnerus, J.A. *et al.* Systematic review: the role of different types of fibre in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;19(3):245-51.
- (63) Nakao, M., Ogura, Y., Satake, S. *et al.* Usefulness of soluble dietary fiber for the treatment of diarrhea during enteral nutrition in elderly patients. *Nutrition*. 2002;18(1):35-9.
- (64) Pereira, M.A. & Pins, J.J. Dietary fiber and cardiovascular disease: experimental and epidemiologic advances. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2(6):494-502.
- (65) Tjonneland, A.M., Overvad, K., Bingham, S.A. *et al.* Dietary fibers in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Ugeskr Laeger*. 2004;166(25):2458-60.

-
- (66) Guillon, F. & Champ, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res Int.* 2000;33(3):233-45.
- (67) McCarty, M.F. Nutraceutical resources for diabetes prevention--an update. *Med Hypotheses.* 2005;64(1):151-8.
- (68) American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. *J AM Diet Assoc.* 2008;108(10):1716-31.
- (69) Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125(6):1401-12.
- (70) Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004;17(2):259-75.
- (71) Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z. *et al.* Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr.* 2009;101(4):541-50.
- (72) Petry, N., Egli, I., Chassard, C. *et al.* Inulin modifies the bifidobacteria population, fecal lactate concentration, and fecal pH but does not influence iron absorption in women with low iron status. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(2):325-31.
- (73) Whisner, C.M., Martin, B.R., Schoterman, M.H. *et al.* Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double-blind cross-over trial. *Br J Nutr.* 2013;110(7):1292-303.
- (74) Lindsay, J.O., Whelan, K., Stagg, A.J. *et al.* Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut.* 2006;55(3):348-55.
- (75) Yen, C.H., Kuo, Y.W., Tseng, Y.H. *et al.* Beneficial effects of fructo-oligosaccharides supplementation on fecal bifidobacteria and index of peroxidation status in constipated nursing-home residents--a placebo-controlled, diet-controlled trial. *Nutrition.* 2011;27(3):323-8.

- (76) Yang, J., Martinez, I., Walter, J. *et al.* *In vitro* characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe*. 2013;23:74-81.
- (77) Martinez, I., Kim, J., Duffy, P.R. *et al.* Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects. *PLoS One*. 2010;5(11):e15046.
- (78) Lappi, J., Salojärvi, J., Kolehmainen, M. *et al.* Intake of whole-grain and fiber-rich rye bread versus refined wheat bread does not differentiate intestinal microbiota composition in Finnish adults with metabolic syndrome. *J Nutr*. 2013;143(5):648-55.
- (79) Shinohara, K., Ohashi, Y., Kawasumi, K. *et al.* Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe*. 2010;16(5):510-5.
- (80) Connolly, M.L., Tuohy, K.M. & Lovegrove, J.A. Wholegrain oat-based cereals have prebiotic potential and low glycaemic index. *Br J Nutr*. 2012;108(12):2198-206.
- (81) Topping, D.L. & Clifton, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1031-64.
- (82) Ruppin, H., Bar-Meir, S., Soergel, K.H. *et al.* Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*. 1980;78(6):1500-7.
- (83) Slavin, J.L., Savarino, V., Paredes-Diaz, A. & Fotopoulos G. A review of the role of soluble fiber in health with specific reference to wheat dextrin. *J Int Med Res*. 2009;37(1):1-17.
- (84) Vince, A., Killingley, M. & Wrong, O.M. Effect of lactulose on ammonia production in a fecal incubation system. *Gastroenterology*. 1978;74(3):544-9.
- (85) Hijova, E. & Chmellarova, A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy*. 2007;108(8):354-8.
- (86) Hong, Y.H., Nishimura, Y., Hishikawa, D. *et al.* Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*. 2005;146(12):5092-9.

-
- (87) Scheppach, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*. 1994;35(1 Suppl):S35-S38.
- (88) Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. & Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(20):2826-32.
- (89) Xiong, Y., Miyamoto, N., Shibata, K. *et al*. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(4):1045-50.
- (90) Hinnebusch, B.F., Meng, S., Wu, J.T. *et al*. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr*. 2002;132(5):1012-7.
- (91) Al-Lahham, S.H., Roelofsen, H., Priebe, M. *et al*. Regulation of adipokine production in human adipose tissue by propionic acid. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(5):401-7.
- (92) Ardawi, M.S. & Newsholme, E.A. Fuel utilization in colonocytes of the rat. *Biochem J*. 1985;231(3):713-9.
- (93) Gaudier, E., Jarry, A., Blottiere, H.M. *et al*. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(6):G1168-G1174.
- (94) Peng, L., He, Z., Chen, W. *et al*. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr Res*. 2007;61(1):37-41.
- (95) Zhang, Y., Zhou, L., Bao, Y.L. *et al*. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chem Biol Interact*. 2010;185(3):174-81.
- (96) Segain, J.P., Raingeard, dlB., Bourreille, A. *et al*. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000;47(3):397-403.

- (97) Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A. *et al.* Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis*. 2001;22(10):1675-80.
- (98) Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K. *et al.* Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(2):104-19.
- (99) Barry, J.L., Hoebler, C., Macfarlane, G.T. *et al.* Estimation of the fermentability of dietary fibre *in vitro*: a European interlaboratory study. *Br J Nutr*. 1995;74(3):303-22.
- (100) Segal, I., Hassan, H., Walker, A.R. *et al.* Fecal short chain fatty acids in South African urban Africans and whites. *Dis Colon Rectum*. 1995;38(7):732-4.
- (101) Jenkins, D.J., Vuksan, V., Kendall, C.W. *et al.* Physiological Effects of Resistant Starches on Fecal Bulk, Short Chain Fatty Acids, Blood Lipids and Glycemic Index. *J Am Coll Nutr*. 1998;17(6):609-16.
- (102) McOrist, A.L., Miller, R.B., Bird, A.R. *et al.* Fecal butyrate levels vary widely among individuals but are usually increased by a diet high in resistant starch. *J Nutr*. 2011;141(5):883-9.
- (103) Taberero, M., Venema, K., Maathuis, A.J. & Saura-Calixto, F.D. Metabolite production during *in vitro* colonic fermentation of dietary fiber: analysis and comparison of two European diets. *J Agric Food Chem*. 2011;59(16):8968-75.
- (104) Bridges, S.R., Anderson, J.W., Deakins, D.A. *et al.* Oat bran increases serum acetate of hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*. 1992;56(2):455-9.
- (105) Mallillin AC, Trinidad TP, Raterta R *et al.* Dietary fibre and fermentability characteristics of root crops and legumes. *Br J Nutr*. 2008;100(3):485-8.
- (106) Finley, J.W., Burrell, J.B. & Reeves, P.G. Pinto bean consumption changes SCFA profiles in fecal fermentations, bacterial populations of the lower bowel, and lipid profiles in blood of humans. *J Nutr*. 2007;137(11):2391-8.
- (107) Del Río, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., 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):1818-92.
- (108) Saura-Calixto, F. & Goni, I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009;49(2):145-52.
- (109) Ovaskainen, M.L, Torronen, R., Koponen, J.M. *et al*. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr*. 2008;138(3):562-6.
- (110) Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1 Suppl):223S-9S.
- (111) Etxeberria, U., Fernandez-Quintela, A., Milagro, F.I. *et al*. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *J Agric Food Chem*. 2013;61(40):9517-33.
- (112) Selma, M.V., Espin, J.C. & Tomas-Barberan, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem*. 2009;57(15):6485-501.
- (113) Duda-Chodak, A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol*. 2012;63(5):497-503.
- (114) Rodriguez Vaquero, M.J., Aredes Fernandez, P.A., Manca de Nadra, M.C. & Strasser de Saad, A.M. Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *J Agric Food Chem*. 2010;58(10):6048-52.
- (115) Saavedra, M.J., Borges, A., Dias, C. *et al*. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med Chem*. 2010;6(3):174-83.
- (116) Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.S. & Lee, Y.K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol*. 2006;157(9):876-84.
- (117) Massot-Cladera, M., Perez-Berezo, T., Franch, A. *et al*. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys*. 2012;527(2):105-12.

- (118) Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J. *et al.* Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(1):62-72.
- (119) Jin, J.S., Touyama, M., Hisada, T. & Benno, Y. Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to *Bifidobacterium* species. *Microbiol Immunol.* 2012;56(11):729-39.
- (120) Vendrame, S., Guglielmetti, S., Riso, P. *et al.* Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J Agric Food Chem.* 2011;59(24):12815-20.
- (121) Queipo-Ortuño, M.I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M. *et al.* Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(6):1323-34.
- (122) Saura-Calixto, F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J Agric Food Chem.* 2011;59(1):43-9.
- (123) Kaminogawa, S. & Nanno, M. Modulation of Immune Functions by Foods. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2004;1(3):241-50.
- (124) Instituto Nacional de Estadística (INE). Indicadores demográficos básicos: esperanza de vida al nacimiento según sexo. Disponible en:
<http://ine.es/jaxiBD/menu.do?L=0&divi=IDB&his=0&type=db>. (Citado el 29 de Diciembre de 2013).
- (125) Instituto Nacional de Estadística (INE). Nota de prensa sobre Proyección de la Población de España a Largo Plazo, 2009-2049. 29 de Enero de 2010.
- (126) Fundación general CSIC. Informe sobre envejecimiento. (Noviembre 2010: Madrid, España).
- (127) Arbonés, G., Carvajal, A., Gonzalvo, B. *et al.* Nutrición y recomendaciones dietéticas para personas mayores. Grupo de trabajo "Salud pública" de la Sociedad Española de Nutrición (SEN). *Nutr Hosp.* 2003;18:109-37.

- (128) Gómez, C.R., Boehmer, E.D. & Kovacs, E.J. The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:457-62.
- (129) Larbi, A., Franceschi, C., Mazzatti, D. *et al.* Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda).* 2008;23:64-74.
- (130) Ennist, D.L. Humoral immunosenescence: an update. *Rev Biol Res Aging.* 1990;4:105-20.
- (131) Lesourd, B.M. & Meaume, S. Cell mediated immunity changes in ageing, relative importance of cell subpopulation switches and of nutritional factors. *Immunol Lett.* 1994;40(3):235-42.
- (132) Franceschi, C., Bonafe, M. & Valensin, S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine.* 2000;18(16):1717-20.
- (133) Tracy RP. Emerging relationships of inflammation, cardiovascular disease and chronic diseases of aging. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27 Suppl 3:S29-S34.
- (134) Xu, X., Xu, P., Ma, C. *et al.* Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):318-37.
- (135) Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* 2012;488(7410):178-84.
- (136) Woodmansey, E.J. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol.* 2007;102(5):1178-86.
- (137) Rehman, T. Role of the gut microbiota in age-related chronic inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012;12(4):361-7.
- (138) Bouhnik, Y., Achour, L., Paineau, D. *et al.* Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutr J.* 2007;6:42.
- (139) Vulevic, J., Drakoularakou, A., Yaqoob, P. *et al.* Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(5):1438-46.

- (140) Braman, S.S. The global burden of asthma. *Chest*. 2006;130(1):4s-12s.
- (141) Litonjua, A.A. Fat-soluble vitamins and atopic disease: what is the evidence? *Proc Nutr Soc*. 2012;71(1):67-74.
- (142) Strachan, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259-60.
- (143) Blaser, M.J & Flakow, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:887-94.
- (144) Bottcher, M.F., Nordin, E.K., Sandin, A. *et al*. Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(11):1590-6.
- (145) Hardy, H., Harris, J., Lyon, E. *et al*. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013;5(6):1869-912.
- (146) Szajewska, H. Understanding the role of probiotics and prebiotics in preventing allergic disease: evidence and methodological issues. *Immunotherapy*. 2013;5(8):869-78.
- (147) Hochberg, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1725.
- (148) López, P., Mozo, L., Gutiérrez, C. & Suárez, A. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus*. 2003;12(11):860-5.
- (149) Bruce, I.N. 'Not only...but also': factors that contribute to accelerated atherosclerosis and premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(12):1492-502.
- (150) Agmon-Levin, N., Blank, M., Paz, Z. & Shoenfeld, Y. Molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18(13):1181-5.
- (151) Sebastiani, G.D. & Galeazzi, M. Infection-genetics relationship in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18(13):1169-75.

- (152) Gul'neva, M.I., Romanov, V.A. & Shilkina, N.P. Intestinal microecology in some systemic connective tissue diseases. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2007;(4):38-41.
- (153) Canche-Pool, E.B., Cortez-Gomez, R., Flores-Mejia, R. *et al.* Probiotics and autoimmunity: an evolutionary perspective. *Med Hypotheses.* 2008;70(3):657-60.
- (154) Burney, P.G., Luczynska, C., Chinn, S. & Jarvis, D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J.* 1994;7(5):954-60.
- (155) Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F. *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25(11):1271-7.
- (156) Centro de Enseñanza Superior de Nutrición Humana y Dietética (CESNID). Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Barcelona: McGraw-Hill: Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona; 2008.
- (157) United States Department of Agriculture (USDA). Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964> (citado el 14 de Febrero de 2012).
- (158) Marlett, J.A. & Cheung, T.F. Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 1997;97(10):1139-48, 1151.
- (159) Roberts, J., Jones, G.P., Rutsihauser, I. *et al.* Resistant starch in the Australian diet. *Nutr Diet.* 2004;61:98-104.
- (160) Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F. *et al.* Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database (Oxford) 2010;2010:bap024.
- (161) Federación Española de Sociedades de Nutrición AyDF. Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la Población Española. *Act Diet.* 2010;14(4):196-7.

- (162) Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Regnard, K. *et al.* Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(10):1176-83.
- (163) Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M. *et al.* Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radic Res.* 2005;39(9):949-61.
- (164) Milani, C., Hevia, A., Foroni, E. *et al.* Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One* 2013;8(7):e68739.
- (165) Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7(5):335-6.
- (166) Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2460-1.
- (167) Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M. *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 2011;21(3):494-504.
- (168) Cole, J.R., Wang, Q., Cárdenas, E. *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D141-D145.
- (169) Serra Majem, L. & Aranceta Bartrina, J. Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). *Rev Esp Nutr Comunitaria.* 2011;17(4):178-99.
- (170) Cuervo, M., Garcia, A., Ansorena, D. *et al.* Nutritional assessment interpretation on 22,007 Spanish community-dwelling elders through the Mini Nutritional Assessment test. *Public Health Nutr.* 2009;12(1):82-90.
- (171) Villarino Rodríguez, A., García-Linares, M.C., García-Arias, M.T. & García-Fernández, M.C. Valoración antropométrica e ingesta de vitaminas de un grupo de ancianos institucionalizados de la provincia de León (España). *Nutr Hosp.* 2002;17(6):190-295.

- (172) Michelakos, T., Kousoulis, A.A., Katsiardanis, K. *et al.* Serum folate and B₁₂ levels in association with cognitive impairment among seniors: results from the Velestino study in Greece and meta-analysis. *J Aging Health*. 2013;25(4):589-616.
- (173) Report of a Joint FAO/WHO Workshop on Fruit and Vegetables for Health. (2004: Kobe, Japan).
- (174) Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S. & Dallongeville, J. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr*. 2006;136(10):2588-93.
- (175) Genkinger, J.M., Platz, E.A., Hoffman, S.C. *et al.* Fruit, vegetable, and antioxidant intake and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. *Am J Epidemiol*. 2004;160(12):1223-33.
- (176) Zhang, X., Shu, X.O., Xiang, Y.B. *et al.* Cruciferous vegetable consumption is associated with a reduced risk of total and cardiovascular disease mortality. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(1):240-6.
- (177) Gonzalez, S., Cuervo, A. & Lasheras, C. Polyphenol intake in elderly people is associated with lipid oxidative damage. *J Am Coll Nutr*. 2013;32(6):384-90.
- (178) Mozaffarian, D., Kumanyika, S.K., Lemaitre, R.N. *et al.* Cereal, fruit, and vegetable fiber intake and the risk of cardiovascular disease in elderly individuals. *JAMA*. 2003;289(13):1659-66.
- (179) Huerta, J.M., González, S., Fernández, S. *et al.* Lipid peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: a five-year longitudinal study. *Free Radic Res*. 2006;40(6):571-8.
- (180) Gallagher, J.C. Vitamin D and aging. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2013;42(2):319-32.
- (181) Mata, P., Alvarez-Sala, L.A., Rubio, M.J. *et al.* Effects of long-term monounsaturated- vs polyunsaturated-enriched diets on lipoproteins in healthy men and women. *Am J Clin Nutr*. 1992;55(4):846-50.

- (182) Shaheen, S.O., Sterne, J.A., Thompson, R.L. *et al.* Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(10 Pt 1):1823-8.
- (183) Riedl, M.A., Nel, A.E. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(1):49-56.
- (184) Wu, P.W., Rhew, E.Y., Dyer, A.R. *et al.* 25-hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;61(10):1387-95.
- (185) Borges, G., Lean, M.E., Roberts, S.A. & Crozier, A. Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. *Food Funct.* 2013;4(5):754-62.
- (186) Baker, R. & Cameron, R. Clouds of Citrus juice and juice drink. *Food Technol.* 1999;53(1):64-9.
- (187) Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., Ferreres, F. & Tomas-Barberan, F.A. *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J Agric Food Chem.* 2001;49(2):1035-41.
- (188) Celiz, G., Audisio, M.C. & Daz, M. Antimicrobial properties of prunin, a citric flavanone glucoside, and its prunin 6"-O-lauroyl ester. *J Appl Microbiol.* 2010;109(4):1450-7.
- (189) Mazimba, O., Masesane, I.B. & Majinda, R.R. A flavanone and antimicrobial activities of the constituents of extracts from *Mundulea sericea*. *Nat Prod Res.* 2012;26(19):1817-23.
- (190) Christensen, H.R., Frokiaer, H. & Pestka, J.J. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol.* 2002;168(1):171-8.
- (191) Costabile, A., Klinder, A., Fava, F. *et al.* Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr.* 2008;99(1):110-20.

- (192) Langkamp-Henken, B., Nieves, C., Jr., Culpepper, T. *et al.* Fecal lactic acid bacteria increased in adolescents randomized to whole-grain but not refined-grain foods, whereas inflammatory cytokine production decreased equally with both interventions. *J Nutr.* 2012;142(11):2025-32.
- (193) Walton, G.E., Lu, C., Trogh, I. *et al.* A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. *Nutr J.* 2012;11:36.
- (194) Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Druart, C. *et al.* Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, *Roseburia* and *Bacteroides/Prevotella* in diet-induced obese mice. *PLoS One.* 2011;6(6):e20944.
- (195) Van den Abbeele, P., Gerard, P., Rabot, S. *et al.* Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ Microbiol.* 2011;13(10):2667-80.
- (196) Brighenti, F., Casiraghi, M.C., Baggio, C. Resistant starch in the Italian diet. *Br J Nutr.* 1998;80(4):333-41.
- (197) Jung, C.M., Heinze, T.M., Schnackenberg, L.K. *et al.* Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;297(2):266-73.
- (198) Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R. & Manca de Nadra, M.C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Contr.* 2007;18:93-101.
- (199) Gross, G., Jacobs, D.M., Peters, S. *et al.* *In vitro* bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J Agric Food Chem.* 2010;58(18):10236-46.
- (200) Dik, V.K., Bueno-de-Mesquita, H.B., Van Oijen, M.G. *et al.* Coffee and tea consumption, genotype based CYP1A2 and NAT2 activity, and colorectal cancer risk - results from the EPIC cohort study. *Int J Cancer.* 2013.
- (201) Kosiewicz, M.M., Zirnheld, A.L. & Alard, P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front Microbiol.* 2011;2:180.

- (202) Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;500(7461):232-6.
- (203) Nakayama, T. & Oishi, K. Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;343(2):161-8.
- (204) Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J. *et al.* Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *Int J Food Microbiol*. 2009;130(2):117-21.
- (205) Mills, C.E., Oruna-Concha, M.J., Mottram, D.S. *et al.* The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chem*. 2013;141(4):3335-40.
- (206) Micallef, M., Lexis, L. & Lewandowski, P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J*. 2007;6:27.
- (207) Avellone, G., Di Garbo, V., Campisi, D. *et al.* Effects of two Sicilian red wines on some cardiovascular risk factors. *Ital Heart J Suppl* 2004;5(5):382-8.
- (208) Okada, Y., Oh-oka, K., Nakamura, Y. *et al.* Dietary resveratrol prevents the development of food allergy in mice. *PLoS One*. 2012;7(9):e44338.
- (209) Nakayama, J., Kobayashi, T., Tanaka, S. *et al.* Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63(3):397-406.
- (210) Alard, P., Parnell, S., Manirarora, J. *et al.* Probiotics control lupus progression via induction of regulatory cells and IL-10 production. *J Immunol*. 2009;182:50.30.
- (211) Sembries, S., Dongowski, G., Mehrlander, K. *et al.* Physiological effects of extraction juices from apple, grape, and red beet pomaces in rats. *J Agric Food Chem*. 2006;54(26):10269-80.
- (212) Konieczna, P., Akdis, C.A., Quigley, E.M. *et al.* Portrait of an immunoregulatory *Bifidobacterium*. *Gut Microbes*. 2012;3(3):261-6.

- (213) López, P., González-Rodríguez, I., Sánchez, B. *et al.* Interaction of *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 with HT29 cells influences regulatory-T-cell-associated chemokine receptor expression. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(8):2850-7.
- (214) López, P., González-Rodríguez, I., Sánchez, B. *et al.* Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine.* 2012;30(5):825-9.
- (215) Ghanim, H., Sia, C.L., Upadhyay, M. *et al.* Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(4):940-9.
- (216) Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(43):16731-6.
- (217) Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C. *et al.* Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat Res.* 2005;591(1-2):237-46.
- (218) Sutton, A.L., Kephart, K.B., Verstegen, M.W. *et al.* Potential for reduction of odorous compounds in swine manure through diet modification. *J Anim Sci.* 1999;77(2):430-9.
- (219) Duthie, G.G., Pedersen, M.W., Gardner, P.T. *et al.* The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 1998;52(10):733-6.
- (220) Tsang, C., Higgins, S., Duthie, G.G. *et al.* The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Br J Nutr.* 2005;93(2):233-40.
- (221) Shahidi, F. & Naczk, M. Wine. En: TechnomicPublishing Co., editor. Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Pennsylvania: 2013. p. 136-48.
- (222) Hadley, M. & Draper, H.H. Identification of N-(2-propenal)ethanolamine as a urinary metabolite of malondialdehyde. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(1):49-52.

- (223) Kadiiska, M.B., Gladen, B.C., Baird, D.D. *et al.* Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005;38(6):698-710.
- (224) Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Buring, J.E. & Rifai, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342(12):836-43.
- (225) Sirk, T.W., Brown, E.F., Friedman, M. & Sum, A.K. Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity. *J Agric Food Chem* 2009;57(15):6720-8.
- (226) Mazari, L. & Lesourd, B.M. Nutritional influences on immune response in healthy aged persons. *Mech Ageing Dev* 1998;104(1):25-40.
- (227) Puertollano, M.A., Puertollano, E., Álvarez de Cienfuegos, G. & de Pablo, M.A. Significance of olive oil in the host immune resistance to infection. *Br J Nutr* 2007;98 Suppl 1:S54-S58.
- (228) Yaqoob, P. Monounsaturated fatty acids and immune function. *Eur J Clin Nutr* 2002 Aug;56 Suppl 3:S9-S13.

**INFORME SOBRE LAS
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**

La presente Tesis Doctoral está compuesta por 5 publicaciones científicas cuya información se detalla a continuación.

Los trabajos **“Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly”** (Publicación 1) (DOI: 10.1080/07315724.2013.827047), y **“Red wine consumption is associated with fecal microbiota and malondialdehyde in a human population”** (Publicación 4) (DOI: 10.1080/07315724.2014.904763), han sido publicado y aceptado para su publicación, respectivamente, en la revista *Journal of the American College of Nutrition* (J Am Coll Nutr, ISSN: 0731-5724). Dicha revista, se encuentra en la posición 48 de las 70 que forman parte de la categoría *Nutrition & Dietetics*, y presenta un factor de impacto de 1,738 en 2012, de acuerdo con el Journal Citation Reports (JCR) ® de Thomsom Reuters.

La Publicación 2, **“Microbiota modulation by diet in humans. Prebiotics, fibres and other compounds”**, ha sido divulgada en la revista italiana *Agro Food Industry Hi-Tech* (Agro Food Ind Hi-Tech, ISSN: 1722-6996), que ocupa la posición 116 de las 124 que componen la categoría *Food Science and Technology*, y presenta un factor de impacto de 0,234.

El trabajo **“Fibers from regular diet are directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly”** (Publicación 3) (DOI: 10.1016/j.nutres.2013.05.016) ha sido publicado en la revista americana *Nutrition Research* (Nutr Res, ISSN: 0271-5317), que ocupa la

posición 38 dentro de la categoría *Nutrition & Dietetics*, y presenta un factor de impacto de 2,142.

Por último, la Publicación 5, titulada **“Fatty acids intake and immune parameters in the elderly”** (DOI: 10.3305/nh.2013.28.2.6183), ha sido divulgada en la revista española *Nutrición Hospitalaria* (Nutr Hosp, ISSN: 0212-1611), con un factor de impacto de 1,305, y en la posición 57 dentro de la categoría *Nutrition & Dietetics*.