

EFFECTO DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN DEL TRIPTÓFANO EN LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL EN UN MODELO *IN VITRO* DE COLON.

Abecia, L., McCartney, A.L. y Klinder, A.

Food Microbial Sciences Unit, School of Chemistry, Food Biosciences and Pharmacy,
P O Box 226, Whiteknights, RG6 6AP, University of Reading, Inglaterra. labecia@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes procesos digestivos en humana que cursan con problemas de permeabilidad intestinal: intolerancia alimentaria, enfermedad de Crohn y celiaca e infecciones intestinales. El incremento de permeabilidad de la mucosa epitelial surge por un debilitamiento de las uniones oclusivas (que sirven para mantener las células unidas y para prevenir el flujo de sustancias entre las células epiteliales) y a través de una degradación de la capa de mucosa que protege el tracto intestinal. Se ha descrito que el contenido luminal del intestino afecta la integridad de la barrera epitelial tanto *in vitro* (Hashimoto et al. 1995) como *in vivo* (Kansagra et al. 2003). La microbiota intestinal es un ecosistema diverso que contiene una amplia variedad de bacterias, cada una de las cuales producen metabolitos específicos y tienen el potencial para interactuar con el hospedador de diferente manera (Tannock, 2001). Los ácidos grasos de cadena corta indujeron un ajuste de las uniones oclusivas en un ensayo con líneas celulares Caco-2 utilizando resistencia eléctrica transepitelial (TER) (Mariadasan et al. 1997). Se ha descrito también que las bacterias colónicas afectan la permeabilidad de las uniones intercelulares oclusivas. García-Lafuente y colaboradores (2001) encontraron que *Lactobacillus brevis* redujo la permeabilidad de la barrera mientras que cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, y *Klebsiella pneumoniae* incrementaron la permeabilidad. Otro grupo de investigadores, ha mostrado que las enterotoxinas de *Bacteroides fragilis*, disminuyeron la TER y abrieron los espacios entre enterocitos en cultivos celulares *in vitro* de enterocitos confluentes (Wells et al. 1996). En este trabajo se realizó un ensayo de resistencia eléctrica transepitelial para estudiar si los productos de fermentación bacteriana del triptófano afectan la fuerza de las uniones celulares *in vitro*, utilizando la línea celular Caco-2 como modelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para estudiar *in vitro* la distribución de los microorganismos relacionados con el metabolismo del triptófano, se utilizaron 6 fermentadores continuos con pH controlado (6.8). El medio basal contenía (por litro): 0.4 g KH_2PO_4 , 0.53 g Na_2HPO_4 , 0.3 g NH_4Cl , 0.3 g NaCl , 0.1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.11 g CaCl_2 , 0.5 mg resazurina, 4 g NaHCO_3 , 0.25 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g L-Cysteine HCl, 1 ml de solución completa de oligoelementos y 1 ml de solución de vitaminas. Este medio fue suplementado con 1% de L-tryptophan (Sigma-Aldrich) y el pH ajustado a 6.8. Cada fermentador con 90 ml del medio (TRP) fue inoculado con 10 ml de un 10% de muestra fecal fresca preparada en agua destilada anaeróbica de 6 individuos diferentes. A las 24h comenzó la alimentación continua a ritmo de flujo de 5ml/h que corresponde a 20h de tiempo de tránsito.

Después de 312 h de experimento con alimentación continua se tomaron muestras (50ml) y se centrifugaron a 13000 xg y 4°C por 60 min y el sobrenadante fue filtrado en una campana estéril y almacenado a -20 °C hasta su posterior utilización. Además, se aislaron los microorganismos presentes al final de la fermentación en un agar rico en nutrientes (Wilkins-Chalgren) y una vez purificados (tras tres pases) se extrajo el DNA de las colonias con la matriz Insta Gene (Bio-Rad Laboratories, Ind) para la secuenciación y posterior identificación del gen *16S rRNA*.

Las líneas celulares Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares para la Microbiología Aplicada e Investigación (ECACC, Salisbury, UK) y fueron cultivados en monocapa con el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) que contenía 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina y piridoxina, suplementada con un 10% de suero bovino fetal y 1% de mezcla de penicilina-estreptomina (Cambrex BioScience; Wokingham, Berkshire, UK) a 37°C y 5% CO_2 .

El método de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) propuesto por Morrow y colaboradores (1996) se utilizó para medir la integridad de la monocapa celular. Las células Caco-2 se sembraron en platos de cultivo Coster Transwell (Fisher, UK) de 6 pozos sobre insertos con filtros permeables de poliéster, con un diámetro de poro de $0.4 \mu\text{m}$ y una superficie de crecimiento de 4.67 cm^2 , los cuales fueron recubiertos con 0.01% de colágeno tipo 1 de cola de rata y dejados para secar en una campana estéril. Las células fueron sembradas en los insertos en alícuotas de 2.5 ml a una concentración de 0.5×10^6 células por ml . A su vez, el medio de cultivo (1.5 ml) fue añadido al compartimento basolateral de cada pozo. Se dejaron dos pozos de cada ensayo sin células como blancos. Las células fueron creciendo en estos insertos y el medio se cambió cada 48 h . Después de 7 días de cultivo se tomaron las medidas TER (Ω/cm^2) utilizando para ello un voltímetro epitelial con electrodos de pabillo (Millicell-ERS, Millipore, USA). Las lecturas fueron tomadas cada 24 h hasta que fueron estables (a los $14\text{--}16$ días). En este punto las células se consideraron diferenciadas completamente.

Las lecturas TER se tomaron inmediatamente antes de que las células fueran expuestas a los tratamientos basados en las fermentaciones previas con triptófano. Los sobrenadantes de las fermentaciones se prepararon en un medio esencial mínimo libre de suero al 10% y se colocó un volumen de 2.5 ml en el compartimento superior de los insertos tratados. Un tratamiento de $300 \mu\text{M}$ de ácido desoxicólico (DCA) se incluyó como control positivo y un tratamiento de sólo medio como control negativo. Se tomaron lecturas TER a las 12 h . Todos los tratamientos se llevaron a cabo en triplicado y sólo se tomaron las medidas TER > 600 (Ω/cm^2) ya que valores inferiores no aseguran la integridad de la monocapa.

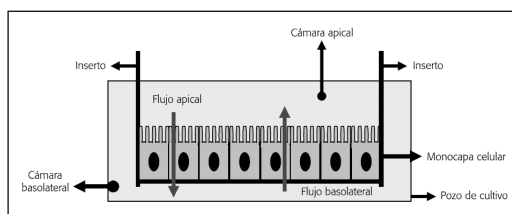


Figura 1. Esquema del montaje experimental

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incubación de las células Caco-2 con DCA produjo un descenso del 93% en TER, indicando un mayor trastorno en la integridad de las uniones oclusivas. La inclusión del medio TRP sin fermentación previa indujo una reducción del 3% en TER por debajo del control negativo. De la misma manera, 5 de los 6 sobrenadantes provenientes de las fermentaciones bacterianas con triptófano produjeron un incremento en la permeabilidad de las membranas de la monocapa celular entre un 6 y un 14% . Sólo uno de ellos se comportó en el rango del control negativo, modificando el porcentaje de cambio por debajo del 1% .

Al final de los 13 días de fermentación con alimentación continua con un medio básico suplementado con triptófano sólo aquellas bacterias capaces de utilizar este amino ácido estarían presentes en el vaso de fermentación. Esas colonias aisladas y mantenidas en anaerobiosis fueron identificadas por la secuencia completa de su gen *16S rRNA* y se observó que *E.coli* estaba presente en todas las fermentaciones, lo que podría explicar el incremento de la permeabilidad previamente detectado por otros investigadores (García-Lafuente et al. 2001). Pero en el caso de los 5 sobrenadantes que dañaron la integridad de la monocapa *Citrobacter freundii* estaba también presente. Sin embargo, en el caso del sobrenadante que no dañó la permeabilidad celular, la biodiversidad fue mayor, es decir, que además de estos dos microorganismos se aislaron del recipiente de fermentación otras dos bacterias: *Citrobacter koseri* y *Citrobacter amalonaticus*.

En las bacterias, los genes que codifican para las regiones *5S*, *16S* y *23S del rRNA* están normalmente organizados en un operón. El número de copias de estos operones en el

genoma de cada bacteria varía entre 1 y 15. *E.coli* posee 7 copias por genoma (Ellwood y Nomura, 1980) y diferentes grupos (Klappenbach et al. 2000; Stevenson y Schmidt, 2004; Shrestha et al. 2007) han demostrado una correspondencia entre el tiempo necesario para formar colonias en un medio complejo y el número de copias de operones rRNA, lo que conferiría una ventaja a la hora de la adaptación a medios fluctuantes en la disponibilidad de recursos. El número de copias de este operón en *Citrobacter* no se ha podido consultar en la bibliografía pero se ha observado por las bandas del DGGE que las diferentes especies poseen más de 5 copias cada una. Estos resultados muestran que pueden existir más especies digestivas capaces de utilizar el triptófano de la misma manera, pero que no pudieron adaptarse al cambio de medio tan rápido como se requería para sobrevivir.

En este experimento se demuestra que los productos de fermentación de alguna de las bacterias comensales del intestino pueden dañar la integridad de la barrera colónica. Los resultados de este experimento parecen sugerir que no sólo las bacterias adheridas a la mucosa intestinal son las que pueden producir daño en las uniones intercelulares incrementando la permeabilidad del lumen a la sangre (Spitz et al. 1994), sino que los productos de fermentación del triptófano de algunas bacterias aisladas del tracto digestivo pueden ejercer un efecto negativo sobre las uniones en función de la microbiota presente en el ecosistema digestivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Ellwood M y Nomura M. 1980. J. Bacteriol 143: 1077-1080. •Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E y Malagelada JR. 2001. Gut 48: 503–507. •Hashimoto K, Takeda K, Nakayama T y Shimizu M. 1995. Biosci Biotechnol Biochem 59: 1951–1952. •Kansagra K, Stoll B, Rognerud C, Niinikoski H, Ou CN, et al. 2003. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285: 1162–1170. • Klappenbach JA, Dunbar JM y Schmidt TM. 2000. A ppl Environ Microbiol 66: 1328-1333. •Mariadasan J, Barkla D y Gibson P. 1997. Am J Physiol 272: G705–G712. •Morrow DMP, Ryan MP y McGlynn H. 1996. Br J Cancer 74: 42. • Shrestha PM, Noll M y Liesack W. 2007. Environ Microbiol 9, 2464-2474. •Spitz J, Hecht G, Taveras M, et al. 1994. Gastroenterology 106: 35–41. • Stevenson BS y Schmidt TM. 2004. Appl Environ Microbiol 70, 6670-6677. •Tannock, G. 2001. Am J Clin Nutr 73, S410-S414. •Wells CL, Van de Westerlo EMA, Jechorek RP, Feltis BA, Wilkins TD y Erlandsen SL. 1996. Gastroenterology 110, 1429-1437.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado gracias a la hospitalidad del profesor Glenn Gibson en su laboratorio y al programa Perfeccionamiento de Doctores en el Extranjero del Gobierno Vasco.

EFFECT OF FERMENTATION PRODUCTS OF TRYPTOPHAN ON TRANS-EPITHELIAL ELECTRICAL RESISTANCE IN AN IN VITRO MODEL OF THE COLON

One feature of different stages of gut problems is the disruption of tight junctions, leading to a loss of integrity across the intestinal barrier. In this experiment, Caco-2 human adenocarcinoma cell lines were used as a model for the intestinal epithelia. Transepithelial electrical resistance (TEER) measurements indicate Caco-2 monolayer integrity. pH-controlled faecal batch continuous culture fermentations were used to study *in vitro* the distribution of the main micro-organisms involved in tryptophan metabolism. Twelve hours of exposure to tryptophan fermentation products was enough to modify TEER measurements. The fermentation products were different depending on the microbiota involved in the amino acid fermentation. *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* were present after 13 days of fermentation and the combination of both decreased TEER and open up the spaces between confluent cell cultures. However, our results indicate that the response of the cells tight junctions varied according to the biodiversity of microorganism present at the end of the experiment in the batch cultures.

Keywords: TEER, tryptophan, fermentation products, caco-2 cell