

PROTEÓMICA GUIADA POR HETEROÁTOMO Y METABOLÓMICA PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS METALES Y METALOIDES CON LA MICROBIOTA INTESTINAL:

“FOOD FOR THOUGHT”

Ana Arias-Borrego, Belén Callejón-Leblic, Sara Ramírez-Acosta, Gema Rodríguez-Moro, Cecilio Parra-Martínez, Sofía Barreales Suárez, Francisco Javier Soto Cruz, María del Carmen Villegas Álvarez, José Luis Gómez-Ariza, Tamara García-Barrera (tamara@uhu.es) Centro de Investigación de Recursos Naturales, Salud y Medio Ambiente (RENSMA). Departamento de Química, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva. Avda. Fuerzas Armadas S/N, 21007, Huelva <http://www.uhu.es/rensmas/presentacion-amabb/>

1. Introducción

Los metales y metaloides pueden entrar en el organismo a través de los alimentos o la contaminación ambiental y pueden ser tóxicos o esenciales. La evidencia acumulada muestra que los metales pueden modular la diversidad, riqueza y composición de la microbiota intestinal, así como actuar de barrera frente a la toxicidad de metales ¹. La microbiota humana es una comunidad ecológica dinámica, compleja y amplia formada por bacterias, virus, arqueas y hongos, que habitan el cuerpo humano y participan en las funciones inmunológicas, metabólicas y fisiológicas del huésped. El término microbioma se refiere a la colección de genes dentro de la microbiota y sus funciones ². En la actualidad, el impacto clave de la microbiota en la salud humana ha sido sobradamente demostrado, además, estos microbios están en comunicación con nuestro cerebro porque pueden producir metabolitos como neurotransmisores y ácidos grasos de cadena corta que pueden afectar a la función cerebral a través del conocido *eje microbiota intestinal-cerebro (GBA)* ³. La dirección de la comunicación no es unidireccional: el cerebro también puede influir en la motilidad, la secreción de hormonas intestinales y el equilibrio microbiano. Así, la microbiota puede influir en la aparición de trastornos neurológicos y cognitivos a través del GBA, en el desarrollo, envejecimiento y reproducción, a través del *eje hipotálamo-hipófisis-gonadal* y en la homeostasis de hormonas tiroideas, a través del *eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo*. (Figura 1). El cuerpo humano contiene alrededor de 100 billones de microorganismos en el intestino, que representan alrededor del 70-80% de la microbiota total ⁴. Otro eje importante es el *eje entero-mamario* (Figura 1), el cual es importante en la transferencia a través de la leche materna de microbiota materna a la descendencia, para su desarrollo en el intestino del lactante. Si nos basamos en la evidencia actual, hay una conexión indirecta entre la lactancia y el GBA. A través de la leche materna, también se transfieren metales y metaloides esenciales y tóxicos ⁵.

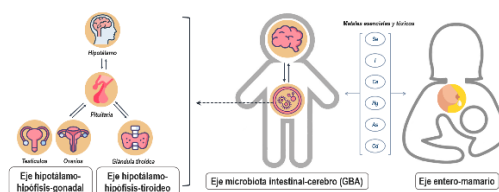


Figura 1. Interacción de los metales y metaloides con la microbiota intestinal a través de diferentes ejes.

Las metodologías ómicas se han convertido en herramientas analíticas clave en un amplio número de áreas de investigación como la biología de sistemas, el análisis medioambiental, la biomedicina o el análisis de alimentos. Son especialmente útiles cuando se combinan proporcionando una nueva perspectiva y una visión holística del problema analítico ⁶. Las metodologías para el análisis de la microbiota se han centrado principalmente en la secuenciación del genoma. Sin embargo, la información proporcionada por estos estudios metagenómicos se limita a la identificación de la presencia de genes, taxones y su funcionalidad inferida. Para investigar en profundidad la funcionalidad microbiana en la salud y la enfermedad, especialmente en las condiciones de disbiosis relacionadas con la exposición a metales y metaloides, resulta esencial la introducción de otras ómicas como la metabolómica y la metalómica. La incógnita sobre el posible impacto de los metales y metaloides en la microbiota intestinal y sus efectos en el GBA apenas comienzan a intuirse, por lo que en la actualidad se requiere un esfuerzo importante desde el punto de vista analítico integrando diversas ómicas basadas en herramientas analíticas de última generación, especialmente aquellas que combinan la espectrometría de masas orgánicas (cuadrupolo-tiempo de vuelo, QTOF, Orbitrap, espectrometría de masas con movilidad iónica, IM-MS) e inorgánicas (plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas, ICP-MS).

2. Especiación química y proteómica guiada por Heteroátomo: selenoproteínas en sangre y leche materna

Es importante destacar que aproximadamente un tercio de todas las proteínas requieren metales como

cofactores para realizar sus funciones⁷ y que los metales tienen una influencia en más del 50% de las proteínas⁸. El metaloma se refiere a las identidades y/o cantidades de metales o metaloides y sus especies en compartimentos celulares, células u organismos⁹. Por tanto, la metalómica es el campo de investigación que proporciona información sobre la identificación, distribución, dinámica, función e impacto de los metales y metaloides en los sistemas biológicos⁸. La especiación química de elementos es importante, además del contenido total, ya que generalmente las especies químicas determinan su toxicidad (*e.g.* cromo (VI), metilmercurio, arsénico inorgánico), función esencial (*e.g.* selenometionina, cromo (III)) o carácter inocuo (*e.g.* arsenobetaína).

La proteómica guiada por Heteroátomo consiste en el análisis de proteínas mediante una técnica de separación acoplada a un ICP-MS, para la detección sensible y selectiva utilizando el Heteroátomo de la biomolécula (un átomo diferente a C, H, N, O o F, *e.g.* Se) como una "etiqueta"¹⁰. Se pueden aplicar varias etapas cromatográficas secuenciales y ortogonales a las fracciones eluidas para purificar las proteínas y aumentar la baja resolución de la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), utilizada habitualmente en la primera etapa de estos estudios (*e.g.* cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de intercambio catiónico (CEC), fase reversa (RP), etc.). Además, la electroforesis se puede utilizar como etapa de separación en lugar de la cromatografía¹¹. El selenio y sus diversas especies químicas se encuentran entre los elementos más estudiados, debido a sus importantes propiedades beneficiosas para la salud.

En este sentido, la combinación de diferentes etapas cromatográficas puede llevarse a cabo en un único cromatograma utilizando un sistema conmutación de columnas como desarrollado para la determinación de selenoproteínas y selenometabolitos en suero humano¹² y leche materna¹³. La figura 2A muestra el acoplamiento instrumental utilizado para la separación de selenoproteínas en suero sanguíneo y la figura 2B en leche materna.

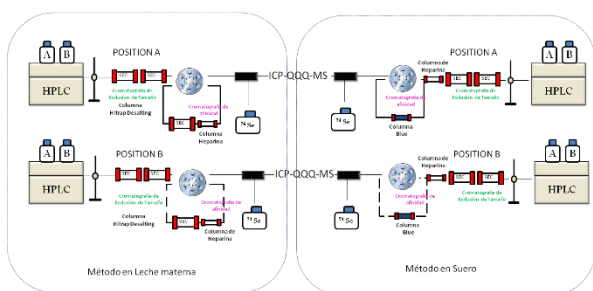


Figura 2. Configuración del sistema de conmutación de válvulas de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a ICP-MS para la especiación de selenoproteínas en: **A)** suero sanguíneo y **B)** leche materna.

La metodología analítica se basa en la combinación de la SEC y la AFC. Cabe destacar que el método analítico utilizado para la leche materna humana permite la separación de selenocistamina (SeCA) y selenoproteína P, lo que no es posible con el método utilizado para suero humano, pero dicho fluido no contiene SeCA. Esta es una de las dificultades más importantes para el análisis simultáneo de selenometabolitos y selenoproteínas en leche materna, ya que ambas moléculas tienen afinidad por la columna de heparina-sefarosa¹⁴. La separación se logró aislando la selenoproteína P (SEPP1) en la columna AFC cambiando la válvula para la elución de SeCA de las dos primeras columnas SEC directamente al ICP-MS. Este método también permitió la separación de selenometabolitos y glutatión peroxidasa. Este método analítico, recientemente desarrollado en nuestro grupo, ha permitido la separación de selenometabolitos y selenoproteínas en leche materna y se ha demostrado la presencia de selenoproteína P, una selenoproteína que transporta selenio al cerebro, afecta la agregación de tau hiperfosforilada y el péptido amiloide- β y posee funciones de señalización a través de ApoER2^{13,15}. En la actualidad trabajamos en la determinación de la posible correlación entre las selenoproteínas en leche materna y la microbiota intestinal del lactante y de la leche materna.

La espectrometría de masas orgánicas (*e.g.* espectrometría de masas de cuadrupolo tiempo de vuelo con ionización por electrospray (ESI-QTOF-MS)) es fundamental en estos estudios para la identificación inequívoca de las proteínas (*e.g.* selenoproteína P). Las proteínas pueden aislarse antes del ICP-MS (detector destructivo), liofilizarse y aplicar una digestión trípica para analizar los péptidos mediante MS con ayuda de base de datos. Los metabolitos (*e.g.* ácido dimetilarésico (DMA), selenocistamina (SeCA), selenometionina (SeMet) también pueden identificarse mediante espectrometría de masas orgánicas y la interpretación bioquímica se realiza mediante análisis de rutas metabolómica. La figura 3 muestra un espectro de masas de un péptido de la selenoproteína P en leche materna.

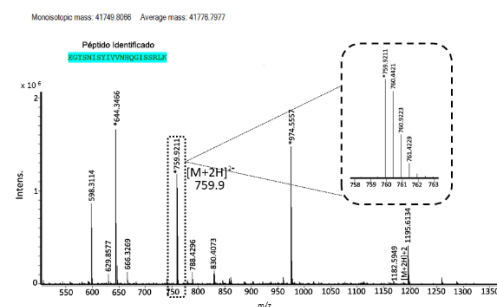


Figura 3. Espectro de masas de péptido de selenoproteína P identificado en leche materna mediante purificación por cromatografía de exclusión de tamaños y de afinidad, digestión trípica y análisis mediante cuadrupolo tiempo de vuelo. En la imagen insertada puede observarse uno de los péptidos doblemente cargados.

3. Metabolómica fecal

La metabolómica es la ómica más cercana al fenotipo en la cascada de ómicas ya que los metabolitos son el último mecanismo de acción después de los genes, transcritos y proteínas (*e.g.* metaloproteínas). Esta ómica fue definida por J. Nicholson en 1999 como la medida de todos los metabolitos (moléculas <1500 Da) en una muestra biológica ¹⁶. El procedimiento metabolómico se caracteriza por una serie de etapas ¹⁷ (Figura 4): (i) selección de un número adecuado de muestras biológicas; (ii) tratamiento de muestra para la extracción de metabolitos; (iii) análisis metabolómico dirigido o no dirigido; (iv) procesamiento de datos para reducir la complejidad; (v) análisis estadístico mediante herramientas que permitan discriminar grupos, (vi) identificación de metabolitos como biomarcadores combinando bases de datos y espectrometría de masas en tándem; (vii) análisis de rutas metabólicas e interpretación de los resultados. Esta ómica se puede integrar fácilmente con otras, por ejemplo, la metabolómica se puede integrar fácilmente con la metalómica para estudiar metabolitos que contienen metales o las alteraciones metabólicas causadas por un xenobiótico ¹⁸.

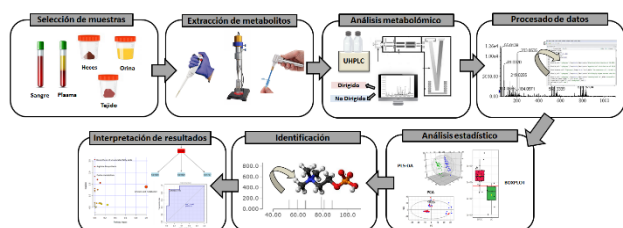


Figura 4. Diagrama de flujo de un análisis metabolómico.

En relación con las técnicas analíticas utilizadas en metalómica, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS). La primera permite una mayor reproducibilidad de los resultados mientras que la MS permite la cuantificación precisa de mezclas complejas. RMN es una técnica no destructiva, pero sus principales defectos son la baja sensibilidad y el elevado coste. Por el contrario, la MS presenta alta sensibilidad, especificidad, amplia cobertura de rango de metabolitos, selectividad y la posibilidad de acoplarse a electroforesis capilar, cromatografía líquida y cromatografía de gases ¹⁹. Las muestras más utilizadas en metabolómica son principalmente plasma, suero, orina, fluido cefalorraquídeo, aliento exhalado, saliva o tejidos, ¹⁹. Concretamente, el hígado y el riñón tienen gran interés en los estudios metabolómicos, ya que son los órganos de mayor actividad metabólica. El cerebro también ha sido gran objeto de estudio en metabolómica debido a que presenta una gran utilidad en el estudio del efecto de los metales en la neurotoxicidad. Para el estudio metabolómico de la microbiota intestinal, las heces han representado una muestra esencial y muy útil debido a su carácter no invasivo. Estas muestras pueden relacionar de forma directa las bacterias intestinales y la fisiología del huésped. Así pues, el metaboloma fecal puede proporcionar información sobre los metabolitos

presentes en el intestino y, por lo tanto, sobre la funcionalidad metabólica de la microbiota. ²⁰. En relación al GBA, los metabolitos más importantes son los neurotransmisores, los aminoácidos y compuestos relacionados. Un aminoácido importante es el ácido γ -aminobutírico (GABA), que es un neurotransmisor del sistema nervioso central. También se han identificado varias neurohormonas en análisis de metabolómica fecal, como acetilcolina, 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), noradrenalina y dopamina (DA). La hipótesis es que estos metabolitos interactúan con el sistema nervioso a través de varias rutas, incluidas las vías endocrina, inmunitaria, neural, del nervio vago y metabólica ²¹. Por lo tanto, la microbiota intestinal produce sustancias como metabolitos relacionados con el triptófano, ácido quinurénico, ácidos grasos de cadena corta, neurometabolitos, GABA, noradrenalina y dopamina que potencialmente se dirigen e influyen en nuestro sistema nervioso central ²¹.

Actualmente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una metodología de metabolómica fecal que ha sido aplicada a muestras de contenido intestinal de ratones suplementados con selenio y con microbiota empobrecida por antibióticos, con el fin de estudiar las posibles asociaciones entre metabolitos fecales, bacterias y selenio en la dieta ²². Los resultados más relevantes mostraron que los niveles de esteroides y ácidos grasos se encontraron alterados en el contenido intestinal de ratones con microbiota empobrecida, y que tras la suplementación de selenio algunos de estos niveles se aproximaron a los del grupo control, indicando que el selenio afecta positivamente a las posibles alteraciones de la microbiota.

4. Impacto de la suplementación de selenio en la microbiota intestinal, las selenoproteínas de plasma y la homeostasis de metales en ratones *Mus musculus*. Spotlight on ACS Journal cover

<https://pubs.acs.org/toc/jafcau/69/27>

En un trabajo reciente de nuestro grupo ²³, se estudió el efecto de la suplementación de selenio y del empobrecimiento de la microbiota por antibióticos en el selenoproteoma y la homeostasis de metales en plasma de ratón. Para ello, se llevó a cabo un experimento con 40 ratones *Mus musculus* divididos en cuatro grupos (10 ratones cada uno, Figura 5): (i) Grupo control, C: ratones alimentados con dieta convencional durante tres semanas (~0,18 mg/kg de Se); (ii) Grupo C-Se: ratones alimentados con una dieta convencional durante una semana seguida de una dieta enriquecida en Se (0,65 mg/kg de selenito de sodio) durante 2 semanas; (iii) Grupo Abx: ratones alimentados con una dieta convencional y agua con un cóctel de antibióticos para empobrecer la microbiota intestinal durante la primera semana. Posteriormente, se alimentan con una dieta convencional durante dos semanas adicionales; (iv) Grupo Abx-Se: ratones alimentado igual que el grupo

Abx seguido de una dieta suplementada con Se durante las dos semanas siguientes.

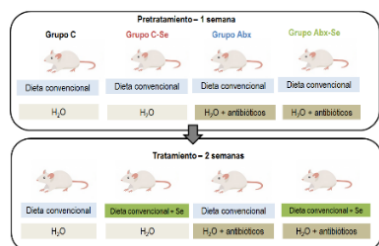


Figura 5. Diseño del experimento.

La metodología analítica empleada para la separación de selenoproteínas se ha descrito en el apartado 2. Simultáneamente, se realizó el análisis de la microbiota mediante secuenciación del gen de 16S ARNr empleando el kit NextEra Index (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). Los resultados obtenidos mostraron que la suplementación con selenio modula la concentración de la selenoproteína glutatión peroxidasa 3 (GPx, función antioxidante) y selenoalbúmina (SeAlb, función transportadora) en plasma, así como la homeostasis de metales. Sin embargo, todo ello depende de que la microbiota intestinal no se haya empobrecido con antibióticos, lo cual sugiere un mecanismo de interacción. El selenio también modula la diversidad y la riqueza de la microbiota intestinal y aumenta la abundancia relativa de algunos taxones relevantes para la salud (por ejemplo, las familias *Christensenellaceae*, *Ruminococcaceae* y el género *Lactobacillus*). Varios estudios han demostrado que el género *Lactobacillus* posee un efecto beneficioso sobre el huésped, y que muchas de sus especies presentan carácter probiótico²⁴ En nuestro trabajo, la abundancia relativa de *Lactobacillus* aumentó significativamente tras la suplementación con selenio, incluso cuando en ratones expuestos a antibióticos para empobrecer su microbiota. Del mismo modo, algunos géneros pertenecientes a las familias *Ruminococcaceae* y *Christensenellaceae* también aumentaron tras la suplementación con selenio. La familia *Ruminococcaceae* es una de las más abundantes en la microbiota intestinal de ratón y se encuentra relacionada principalmente con el mantenimiento de la salud intestinal y algunas funciones enzimáticas, incluyendo la degradación de celulosa a hemicelulosa²⁵. Por otro lado, la suplementación con selenio también estimuló el incremento de varios miembros de la familia *Christensenellaceae* en el grupo control. Sin embargo, el efecto del antibiótico causó una disminución importante de estos miembros, impidiendo poder ser modulados por el selenio. Algunos estudios han confirmado que las bacterias de la familia *Christensenellaceae* se heredan con facilidad en humanos y están relacionadas directamente con la salud²⁶. También encontramos por primera vez correlaciones entre bacterias y selenoproteínas en plasma, especialmente en el grupo Abx-Se, en el que pudimos observar asociaciones significativas y negativas de selenoproteína P con varios

miembros de las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* [Figura 6].

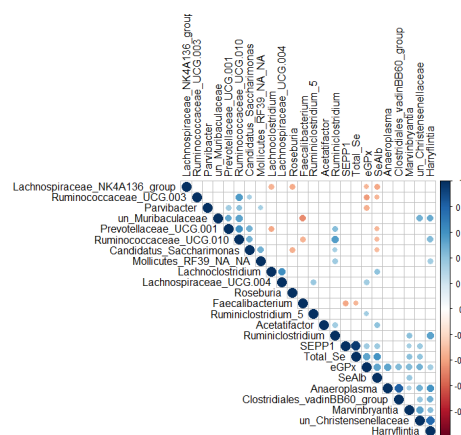


Figura 6. Correlograma mostrando numerosas asociaciones entre selenoproteínas en plasma y microbiota.

En el estudio multielemental en plasma de ratón observamos diferencias significativas entre las concentraciones de diferentes elementos tras la suplementación con selenio, especialmente en el grupo con microbiota empobrecida. La suplementación con selenio aumentó los niveles de Al y Mo en el ratón convencional, y la concentración de Zn en ratones con microbiota empobrecida. Además, la mayoría de diferencias fueron encontradas en el plasma de ratón con microbiota empobrecida y suplementado con selenio (Abx-Se), indicando que en ausencia de microbios la homeostasis de metales es completamente diferente, que por tanto está influenciada por la microbiota intestinal.

5. Conclusiones

La proteómica guiada por Heteroátomo permite la cuantificación absoluta de numerosas proteínas de interés biológico, entre ellas las selenoproteínas. La dimensión cuantitativa de este tipo de análisis es muy importante y aporta a esta metodología analítica numerosas ventajas frente a técnicas moleculares que sólo realizan cuantificación relativa (e.g. western blot), indirecta (determinación de actividades enzimáticas mediante espectrofotometría UV-visible, qPCR) o requieren un patrón comercial de elevada pureza que a veces no es fácil conseguir (e.g. ELISA). Esta ómica permite llevar a cabo estudios de especiación química de metales y metaloides avanzados, que en combinación con otras ómicas como la metabolómica fecal o la metataxonómica permiten avanzar en la investigación de la interacción de los metales y metaloides con la microbiota intestinal.

Referencias

1. Duan, H. *et al.* Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. *Sci. Total Environ.* **742**, 140429 (2020).

2. Collado, M. C., Rautava, S., Isolauri, E. & Salminen, S. Gut microbiota: A source of novel tools to reduce the risk of human disease? *Pediatr. Res.* **77**, 182–188 (2015).
3. Kim, S. *et al.* Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature* **549**, 528–532 (2017).
4. Guarner, F. & Malagelada, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**, 512–519 (2003).
5. Bansa, D. K. *et al.* Cross-sectional assessment of infants' exposure to toxic metals through breast milk in a prospective cohort study of mining communities in Ghana. *BMC Public Health* **17**, 1–12 (2017).
6. Ramírez-Acosta, S. A. Arias-Borrego, F. Navarro-Roldán, M. Selma-Royo, M. Calatayud, M. Carmen Collado, P. V. Huertas-Abril, N. Abril, T. García-Barrera. Omic methodologies for assessing metal(-loid)s-host-microbiota interplay: A review. *Anal. Chim. Acta In Press*, 338620 (2021).
7. Lobinski, R., Becker, J. S., Haraguchi, H. & Sarkar, B. Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **82**, 493–504 (2010).
8. Mounicou, S., Szpunar, J. & Lobinski, R. Metallomics: The concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1119–1138 (2009).
9. Haraguchi, H. Metallomics: The history over the last decade and a future outlook. *Metallomics* **9**, 1001–1013 (2017).
10. Sanz-Medel, A. "Heteroatom-tagged" quantification of proteins via ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 5393–5395 (2016).
11. Ruzik, L. & Kwiatkowski, P. Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS/MS for identification of Zn-binding ligands in Goji berries extracts. *Talanta* **183**, 102–107 (2018).
12. García-Sevillano, M. A., García-Barrera, T. & Gómez-Ariza, J. L. Development of a new column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and selenoproteins in human serum. *J. Chromatogr. A* **1318**, 171–179 (2013).
13. Arias-Borrego, A. B. Callejón-Leblic, G. Rodríguez-Moro, I. Velasco, J. L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera. A novel HPLC column switching method coupled to ICP-MS/QTOF for the first determination of selenoprotein P (SELENOP) in human breast milk. *Food Chem.* **321**, 126692 (2020).
14. Hoová, J., López, I. V., Soblechero, E. G., Arias-Borrego, A. & García-Barrera, T. Digging deeper into the mother-offspring transfer of selenium through human breast milk. *J. Food Compos. Anal.* **99**, 103870 (2021).
15. Un equipo de investigadoras descubre una sustancia que previene enfermedades neurodegenerativas en la leche materna. <https://www.rtve.es/alacarta/videos/todxs-por-igual/equipo-investigadoras-descubre-sustancia-previene-enfermedades-neurodegenerativas-leche-materna/5672016/> (2020).
16. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* vol. 29 1181–1189 (1999).
17. Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 613–646 (2005).
18. Gómez-Ariza, J. L., Jahromi, E. Z., González-Fernández, M., García-Barrera, T. & Gailer, J. Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches to probe health-relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms. *Metallomics* **3**, 566–577 (2011).
19. García-Barrera, T., Rodríguez-Moro, G., Callejón-Leblic, B., Arias-Borrego, A. & Gómez-Ariza, J. L. Mass spectrometry based analytical approaches and pitfalls for toxicometabolomics of arsenic in mammals: A tutorial review. *Anal. Chim. Acta* **1000**, 41–66 (2018).
20. Tang, Q. *et al.* Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 151 (2020).
21. Fiori, J., Turroni, S., Candela, M. & Gotti, R. Assessment of gut microbiota fecal metabolites by chromatographic targeted approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **177**, 112867 (2020).
22. Callejón-Leblic, B., M. Selma-Royo, M. Collado, J. L. Gómez-Ariza, N. Abril, T. García-Barrera. Untargeted gut metabolomics to delve the interplay between selenium supplementation and gut microbiota. *J. Proteome Res.* **Submitted**, (2021).
23. Callejón-Leblic, B., Selma-Royo, M., Collado, M. C., Abril, N. & García-Barrera, T. Impact of Antibiotic-Induced Depletion of Gut Microbiota and Selenium Supplementation on Plasma Selenoproteome and Metal Homeostasis in a Mice Model. *J. Agric. Food Chem.* [acs.jafc.1c02622](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02622) (2021) doi:10.1021/acs.jafc.1c02622.
24. Reid, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3763–3766 (1999).
25. Liu, Z. *et al.* Selenium yeast modulated ileal transcriptome and microbiota to ameliorate egg production in aged laying hens. *Res. Sq. In Press*, (2020).
26. Waters, J. L. & Ley, R. E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* **17**, 1–11 (2019).