



universidad  
de león

# **Estudio y comparación de la microbiota intestinal en individuos no celiacos frente a pacientes diagnosticados de enfermedad celiaca**

**“Study and comparison of the intestinal microbiota in non  
celiac individuals and patients with celiac disease”**

**MARÍA ESTHER NISTAL GONZÁLEZ**

**Universidad de León**

**Dpto. Biología Molecular. Área de Microbiología**



**Memoria presentada para optar al grado de Doctor**

Dña. María Esther Nistal González

León, septiembre de 2011



# Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido a la realización del presente trabajo.

Quiero citar en primer lugar al Dr. Javier Casqueiro, uno de los directores de esta tesis, no sólo por haberme dado la oportunidad de hacer este trabajo, si no por su confianza, apoyo incondicional y disponibilidad. Gracias a él, he aprendido a trabajar de otra forma y afrontar los problemas con optimismo y más seguridad, lo cual ha sido de gran ayuda.

Al los Dres. Santiago Vivas Alegre y José María Ruiz de Morales, por su confianza y ayuda, ya que sin su colaboración no habría sido posible la realización de esta Tesis.

Al Dr. Luis Enrique Sáenz de Miera y a la Dra. Paula Arroyo, por su ayuda en la elaboración del estudio filogenético, que compartieron conmigo todos sus conocimientos de manera desinteresada.

Al Dr. David Bernardo por sus aportaciones y consejos en nuestro trabajo.

Al Dr. Santiago Gutiérrez Martín y a la Dra. Rosa Elena Cardoza por mostrarme sus conocimientos, su ayuda y sus ánimos en los momentos iniciales de esta Tesis durante mi estancia en Ponferrada.

A mis compañeros de grupo, Sandra y Alberto por su colaboración en todo momento y por su amistad, y a los que de forma temporal también han formado parte de nuestro grupo y han colaborado de alguna manera en la realización de esta Tesis, como Hada, María, Laura, Ana y Jennifer.

Al Área de Microbiología donde siempre he recibido el apoyo de todos los profesores, laborales y becarios. Gracias por crear un ambiente adecuado para el desarrollo de este trabajo.

A mis padres, gracias por su cariño y confianza porque siempre están ahí apoyándome y dándome las fuerzas que necesitaba para seguir.

A todos mis amigos y familia: Estela, Javi, Mila, Jorge, Rebeca, Ernesto, Elena, Chelo, Javier,... y muchos más. Gracias por estar siempre a mi lado cuando más lo necesitaba en los momentos más duros, a lo largo de estos cuatro años.

A Pablo, por todo tu cariño, apoyo, por los ánimos que siempre me has dado. Gracias por la tranquilidad que siempre me transmites, por tu paciencia. Te doy las gracias por todos los momentos compartidos y los que seguro vendrán, gracias por estar ahí. Y por supuesto gracias por tus aportaciones a este trabajo.



*A mis padres, familia y amigos...  
y por supuesto a Pablo*



# ÍNDICE

## **I. INTRODUCCIÓN..... 1**

### **1. ENFERMEDAD CELIACA ..... 3**

1.1. Concepto e historia de la enfermedad celiaca..... 3

1.2. Presentación clínica de la enfermedad celiaca..... 4

1.3. Patogénesis..... 5

1.3.1. Factor genético: sistema HLA..... 5

1.3.2. Factor ambiental: el gluten..... 6

1.3.3. Mecanismos inmunológicos..... 6

1.4. Tratamiento..... 7

### **2. MICROBIOTA INTESTINAL ..... 8**

2.1. Composición y distribución en el tracto gastrointestinal..... 8

2.2. Evolución de la microbiota intestinal..... 11

2.3. Factores modificadores de la microbiota intestinal..... 14

2.3.1. Factores microbianos..... 14

2.3.2. Factores propios del individuo..... 15

2.3.2.1. Factores intrínsecos..... 15

2.3.2.2. Factores extrínsecos..... 15

2.4. Funciones de la microbiota intestinal..... 16

2.4.1. Funciones metabólicas..... 16

2.4.2. Funciones tróficas..... 18

2.4.3. Funciones de protección..... 18

### **3. MICROBIOTA INTESTINAL Y ENFERMEDAD ..... 19**

3.1. Enfermedad celiaca y microbiota del intestino delgado..... 20

3.1.1. Microbiota fecal..... 20

3.1.2. Microbiota duodenal..... 21

3.2. Enfermedades inflamatorias intestinales y microbiota intestinal..... 22

3.2.1. Enfermedad de Crohn y microbiota fecal..... 23

3.2.2. Enfermedad de Crohn y microbiota intestinal adherida a la  
superficie mucosa..... 25

3.2.3. Colitis ulcerosa y microbiota fecal..... 26

3.2.4. Colitis ulcerosa y microbiota intestinal adherida a la superficie mucosa.....	27
<b>4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL .....</b>	<b>29</b>
4.1. FISH ( <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> ).....	30
4.2. Colección de clones .....	31
4.3. Técnicas basadas en análisis de perfiles electroforéticos .....	32
4.3.1. DGGE ( <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> ) y TGGE ( <i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i> ).....	32
4.3.2. RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> . Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.....	34
4.4. PCR cuantitativa (qPCR).....	35
4.5. Metagenómica .....	35
<b><u>II. OBJETIVOS .....</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b><u>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</u></b>	<b><u>41</u></b>
<b>1. SUJETOS DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....</b>	<b>43</b>
1.1. Muestras duodenales .....	43
1.2. Muestras fecales .....	44
<b>2. CEPAS BACTERIANAS, VECTORES Y MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>44</b>
2.1. Cepas bacterianas .....	44
2.2. Vectores .....	45
2.3. Medios de cultivo .....	46
2.3.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .....	46
2.3.2. Medios de cultivo empleados con microorganismos aislados a partir de biopsias duodenales.....	47
<b>3. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.....</b>	<b>49</b>
3.1. Cultivo y mantenimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	49
3.2. Cultivo y mantenimiento de los microorganismos aislados a partir de biopsias duodenales .....	49
<b>4. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO .....</b>	<b>50</b>
4.1. Extracción de ADN de biopsias duodenales .....	50

4.2. Extracción de ADN genómico de cultivos bacterianos .....	51
4.3. Extracción de ADN de heces .....	52
4.4. Cuantificación de los ácidos nucleicos .....	53
<b>5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....</b>	<b>53</b>
5.1. PCR.....	53
5.2. Reacciones de PCR-DGGE.....	54
<b>6. ELECTROFORESIS DE ADN.....</b>	<b>55</b>
6.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	55
6.2. Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE) .....	56
6.2.1. Elaboración de los geles.....	56
6.2.2. Electroforesis del ADN en geles en gradiente desnaturalizante.....	57
6.2.3. Extracción de bandas para su secuenciación.....	58
<b>7. TRANSFORMACIÓN Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE</b>	
<b><i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>58</b>
7.1. Reacciones de ligación .....	58
7.2. Transformación de <i>E. coli</i> .....	58
7.3. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> : Minipreparaciones .....	59
7.4. Digestión del ADN con enzimas de restricción .....	60
7.5. Purificación de ADN plasmídico para secuenciación .....	61
<b>8. SECUENCIACIÓN DEL ADN.....</b>	<b>62</b>
<b>9. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....</b>	<b>62</b>
9.1. Análisis comparativo de las secuencias con las bases de datos .....	62
9.2. Alineamiento de las secuencias.....	63
<b>10. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN FILOGENÉTICA .....</b>	<b>63</b>
10.1. Análisis filogenético .....	63
10.2. Riqueza y diversidad .....	64
10.3. Análisis comparativo (UniFrac).....	65
<b>11. ANÁLISIS DE LOS DATOS .....</b>	<b>66</b>
<b><u>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b>1. ESTUDIO MOLECULAR DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LA</b>	
<b>PARTE ALTA DEL INTESTINO DELGADO EN NIÑOS Y ADULTOS.....</b>	<b>71</b>
1.1. Construcción de colecciones de clones del ADNr 16S .....	71

1.2. Composición de las comunidades de bacterias a nivel de filo .....	73
1.3. Composición de las comunidades bacterianas en individuos adultos .....	75
1.4. Composición de las comunidades bacterianas en niños .....	78
1.5. Riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas .....	80
1.5.1. Las curvas de acumulación y rarefacción son adecuadas para evaluar la riqueza de las comunidades bacterianas a nivel de género.....	80
1.5.2. La riqueza observada es diferente en función de la edad y de la dieta.....	84
1.5.3. El estudio de la diversidad de las comunidades determina que existen diferencias en función de la dieta y la edad.....	86
1.6. Análisis comparativo de las comunidades bacterianas.....	88
1.6.1. Análisis comparativo de las comunidades de bacterias de los tres grupos de adultos .....	88
1.6.2. Análisis comparativo de las comunidades de bacterias de niños sanos y enfermos.....	91
1.6.3. Análisis comparativo entre las comunidades de bacterias de niños y adultos .....	91
1.7. Discusión .....	94
1.7.1. Las comunidades de bacterias presentes en la parte alta del intestino delgado de niños y adultos pertenecen a los filos <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> y <i>Bacteroidetes</i> .....	94
1.7.2. Las diferencias más importantes que se observan entre individuos adultos no enfermos celíacos (No-EC <sub>A</sub> ), enfermos celíacos activos (EC <sub>A</sub> ) y enfermos celíacos tratados (ECT <sub>A</sub> ) se deben a la dieta.....	95
1.7.3. <i>Streptococcus</i> y <i>Prevotella</i> muestran el mismo patrón en los niños que en los adultos.....	97
1.7.4. La edad es el principal factor que determina las diferencias entre los niños y los adultos .....	98
<b>2. ESTUDIO MOLECULAR DE LA MICROBIOTA DUODENAL CAPAZ DE CRECER EN UN MEDIO DE CULTIVO CON GLUTEN COMO ÚNICA FUENTE DE NITRÓGENO .....</b>	<b>100</b>

2.1. Análisis molecular mediante PCR-DGGE de la microbiota obtenida a partir del cultivo de biopsias duodenales.....	100
2.2. Análisis molecular de la microbiota obtenida a partir del cultivo de biopsias duodenales mediante la construcción de colecciones de clones del ADNr 16S .....	106
2.3. Aislamiento e identificación de la microbiota duodenal capaz de crecer en un medio de cultivo con gluten.....	110
2.4. Discusión .....	114
2.4.1. La microbiota duodenal identificada mediante PCR-DGGE a partir del cultivo de biopsias está dominada por <i>Streptococcus salivarius</i> y <i>S. oralis</i> .....	114
2.4.2. La construcción de una colección de clones, seguida de un <i>fingerprint</i> con <i>Sau3AI</i> supone un menor esfuerzo de secuenciación.....	115
2.4.3. <i>Staphylococcus hominis</i> y <i>S. epidermidis</i> mostraron actividad proteolítica frente al gluten.....	117
<b>3. ESTUDIO MOLECULAR DE LA MICROBIOTA FECAL DE INDIVIDUOS ADULTOS MEDIANTE PCR-DGGE .....</b>	<b>120</b>
3.1. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores universales .....	120
3.2. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo <i>Lactobacillus</i> .....	124
3.3. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo <i>Bifidobacterium</i> .....	127
3.4. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo <i>Bacteroides</i> .....	131
3.5. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo <i>Clostridium</i> .....	134
3.6. Discusión .....	137
3.6.1. Existe una microbiota fecal asociada a los individuos no enfermos celíacos.....	137
3.6.2. La diversidad de bacterias del grupo <i>Lactobacillus</i> se ve afectada por la dieta.....	138

3.6.3. Las comunidades de bacterias del grupo <i>Bifidobacterium</i> son significativamente menos diversas en los pacientes enfermos celíacos tratados.....	139
3.6.4. Existe una diversidad mayor de bacterias del género <i>Bacteroides</i> en muestras fecales de pacientes enfermos celíacos.....	140
3.6.5. No se han encontrado diferencias significativas entre individuos sanos y enfermos celíacos con respecto a las especies del grupo <i>Clostridium</i> .....	141

**V. CONCLUSIONES..... 143**

**VI. BIBLIOGRAFÍA ..... 147**

**VII. ANEXOS..... 171**

1.1. ANEXO 1: Muestras empleadas en el estudio.....	173
1.2. ANEXO 2: Secuencia del gen ARN ribosomal 16S.....	174
1.3. ANEXO 3: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>A</sub> 1.....	176
1.4. ANEXO 4: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>A</sub> 2.....	177
1.5. ANEXO 5: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>A</sub> 3.....	178
1.6. ANEXO 6: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>A</sub> 4.....	179
1.7. ANEXO 7: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>A</sub> 5.....	180
1.8. ANEXO 8: Árbol filogenético paciente ECA <sub>A</sub> 1.....	181
1.9. ANEXO 9: Árbol filogenético paciente ECA <sub>A</sub> 2.....	182
1.10. ANEXO 10: Árbol filogenético paciente ECA <sub>A</sub> 3.....	183
1.11. ANEXO 11: Árbol filogenético paciente ECA <sub>A</sub> 4.....	184
1.12. ANEXO 12: Árbol filogenético paciente ECA <sub>A</sub> 5.....	185
1.13. ANEXO 13: Árbol filogenético paciente ECT <sub>A</sub> 1.....	186
1.14. ANEXO 14: Árbol filogenético paciente ECT <sub>A</sub> 2.....	187
1.15. ANEXO 15: Árbol filogenético paciente ECT <sub>A</sub> 3.....	188
1.16. ANEXO 16: Árbol filogenético paciente ECT <sub>A</sub> 4.....	189
1.17. ANEXO 17: Árbol filogenético paciente ECT <sub>A</sub> 5.....	190
1.18. ANEXO 18: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>N</sub> 1.....	191
1.19. ANEXO 19: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>N</sub> 2.....	192
1.20. ANEXO 20: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>N</sub> 3.....	193

1.21. ANEXO 21: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>N</sub> 4.....	194
1.22. ANEXO 22: Árbol filogenético paciente No-EC <sub>N</sub> 5.....	195
1.23. ANEXO 23: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 1 .....	196
1.24. ANEXO 24: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 2 .....	197
1.25. ANEXO 25: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 3 .....	198
1.26. ANEXO 26: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 4 .....	199
1.27. ANEXO 27: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 5 .....	200
1.28. ANEXO 28: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 6 .....	201
1.29. ANEXO 29: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 7 .....	202
1.30. ANEXO 30: Árbol filogenético paciente ECA <sub>N</sub> 8 .....	203



## ABREVIATURAS

---

<b>ACP</b>	Análisis de Componentes principales
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	Ácido Desoxirribonucleico Ribosómico
<b>AGCC</b>	Ácidos Grasos de Cadena Corta
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
<b>°C</b>	grado centígrado
<b>CP</b>	Componente Principal
<b>CU</b>	Colitis Ulcerosa
<b>DGGE</b>	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
<b>DSG</b>	Dieta Sin Gluten
<b>EC</b>	Enfermedad Celiaca
<b>ECA<sub>A</sub></b>	Enfermo Celiaco Activo Adulto
<b>ECA<sub>N</sub></b>	Enfermo Celiaco Activo Niño
<b>ECh</b>	Enfermedad de Cronh
<b>EChC</b>	Enfermedad de Cronh localizada en el Colon
<b>EChI</b>	Enfermedad de Cronh localizada en el Íleon
<b>ECT<sub>A</sub></b>	Enfermo Celiaco Tratado Adulto
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamino-tetracético
<b>EII</b>	Enfermedades Inflammatorias Intestinales
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
<b>g</b>	gramo
<b>GC</b>	Guaninas Citosinas
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>h</b>	hora
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitario Humano
<b>M</b>	concentración molar
<b>mM</b>	milimolar
<b>MAP</b>	<i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>
<b>min</b>	minuto
<b>mg</b>	miligramo
<b>mL</b>	mililitro
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>ng</b>	nanogramo
<b>No-EC<sub>A</sub></b>	No Enfermo Celiaco Adulto
<b>No-EC<sub>N</sub></b>	No Enfermo Celiaco Niño
<b>OTU</b>	<i>Operational Taxonomic Unit</i>

<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pH</b>	$-\log [H^+]$
<b>Pro</b>	Prolina
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>RDP</b>	<i>Ribosomal Database Project</i>
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
<b>TGt</b>	Transglutaminasa tisular
<b>TGGE</b>	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
<b>Tris</b>	tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>T-RFLP</b>	<i>Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>TTGE</b>	<i>Temporal temperature gradient gel electrophoresis</i>
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
<b>V</b>	voltios
<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b>x-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido
<b><math>\mu</math>L</b>	microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	micromolar

# INTRODUCCIÓN

---



## 1. ENFERMEDAD CELIACA

### 1.1. Concepto e historia de la enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad inflamatoria del intestino delgado causado por una respuesta inmune inapropiada a las proteínas del gluten del trigo y otras proteínas similares del centeno y la cebada en individuos genéticamente susceptibles. La EC también se conoce como esprue no tropical, enteropatía sensible al gluten o estearorrea idiopática (Holtmeier & Caspary, 2006).

La EC se describió por primera vez en la segunda mitad del siglo II después de Cristo por Areteo de Capadocia, médico helenístico-romano. Su extenso trabajo fue publicado en latín en 1552, donde empleo la palabra griega “koliakos” (de la cual deriva celiaco) para identificar a los pacientes que sufrían del intestino. La presentación clásica de la EC, con malabsorción, fue descrita más tarde por Samuel Gee en 1888 (Gee, 1888) quien postuló que “la regulación de la alimentación es la parte más importante del tratamiento”. Aunque los clínicos empezaron a reconocer y diagnosticar la EC, su etiología fue desconocida hasta 1940, cuando Willem Karel Dicke (Van De Kamer *et al.*, 1953) un pediatra holandés, postuló que los cereales (trigo, cebada y centeno) eran agentes etiológicos de la EC y propuso a los enfermos celiacos seguir una dieta estricta sin gluten, tras la que los pacientes mostraban una clara mejoría. Dicke llegó a esta conclusión tras observar que durante la Segunda Guerra Mundial, en un período en el que escasearon alimentos básicos como el trigo, los pacientes celiacos mejoraban considerablemente, para luego volver a recaer tras el final de la guerra con la reintroducción en la dieta de dichos alimentos. Años más tarde, John W Paulley describió los cambios histológicos que tenían lugar en el intestino de pacientes con EC (Paulley, 1954).



La prevalencia de la EC en la población europea es del 1%. Aunque la EC es uno de los desórdenes inmunes más comunes, existe todavía un número considerable de casos no diagnosticados (da Silva Neves *et al.*, 2010).

Es más apropiado considerar a la EC como un desorden multisistémico, más que un daño únicamente gastrointestinal. Se han descrito numerosas asociaciones de la EC con otras

patologías, muchas de ellas con base inmunológica como dermatitis herpetiforme, diabetes mellitus tipo I o tiroiditis autoinmune. También se la asocia con osteoporosis, malignización e infertilidad, así como alteraciones neurológicas y genéticas (Torres *et al.*, 2007; Briani *et al.*, 2008; Freeman, 2008; Leeds *et al.*, 2008).

## 1.2. Presentación clínica de la enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca puede ser diagnosticada a cualquier edad; sin embargo ésta se manifiesta más comúnmente durante la infancia (entre los 9 y los 24 meses) o durante la tercera o cuarta década de la vida (Ciclitira *et al.*, 2001). Como ocurre en otros desórdenes autoinmunes, la EC es más común en mujeres que en hombres en un ratio de 3:1 (Green *et al.*, 2001).

Los síntomas de la enfermedad difieren considerablemente según la edad de aparición. En los niños pequeños son frecuentes los síntomas intestinales (diarrea, esteatorrea o deposiciones grasas, distensión abdominal, desnutrición) y el retraso del crecimiento. En cambio en los adultos, la enfermedad puede cursar sin síntomas pero asociada a la aparición de complicaciones extraintestinales (van Heel & West, 2006). En el momento actual la proporción de pacientes que manifiestan los síntomas clásicos de la enfermedad tales como malabsorción, pérdida de peso y esteatorrea representan una porción muy pequeña con respecto al total de la población de pacientes con EC. Hace casi veinte años la profesora Anne Ferguson comparó la población de enfermos celíacos con un “iceberg” (Ferguson *et al.*, 1993) para así destacar la variabilidad clínica de la EC y determinar que muchos casos están todavía sin diagnosticar.

Según el modelo del “iceberg” (Figura 1) de la EC, desde un punto de vista clínico podemos encontrar: EC clásica, EC silente, EC latente y EC potencial.

- a) La EC clásica se caracteriza por presentar síntomas gastrointestinales típicos, cambios histológicos y serología positiva. Es la más fácil de detectar y constituye la punta del iceberg.
- b) La EC silente en la que la sintomatología es prácticamente nula, pero los enfermos tienen alterada la mucosa intestinal y presentan marcadores serológicos positivos.
- c) La EC latente, que se trata de enfermos asintomáticos, pero con predisposición genética y que pueden desarrollar la enfermedad de manera súbita (Collin *et al.*, 1999; Holmes, 2001).

- d) La EC potencial, que comprende a los pacientes que tienen predisposición genética (familiares en 1º grado de enfermos celíacos), presentan alteraciones inmunológicas pero las vellosidades intestinales están intactas. Estas tres últimas formas constituyen la parte sumergida del iceberg.

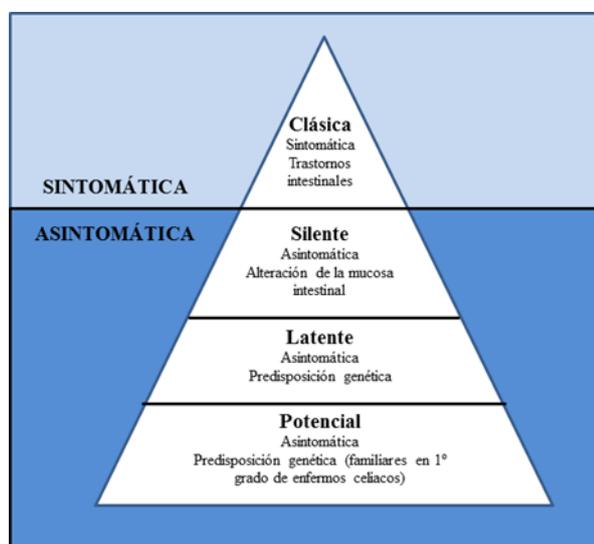


Fig.1 Modelo del “iceberg” en la EC

## 1.3. Patogénesis

### 1.3.1. Factor genético: sistema HLA

La existencia de factores genéticos en la EC, se apoya en la evidencia de que los familiares de primer grado de un paciente celíaco tienen mayor riesgo (10%) de desarrollar la EC que la población general (Hogberg *et al.*, 2003). Además, en gemelos monozigóticos la concordancia para la enfermedad es del 75% (Greco *et al.*, 2002).

Dentro de los factores genéticos, el polimorfismo HLA (antígeno leucocitario humano) tiene una fuerte asociación con la EC. HLA-DQ2, está presente en el 90-95% de enfermos celíacos y el otro 5-10% restante de pacientes celíacos son HLA-DQ8 (Hill & McMillan, 2006). Aunque la posesión de las proteínas HLA es necesaria, no es suficiente para el desarrollo de la EC. Por esta razón se han estudiado otros genes fuera de la región HLA, alguno de los cuales se ha visto que están relacionados con la EC, aunque en menor medida (Plenge, 2010). Las regiones donde se ubican estos genes estarían en los cromosomas 15 y 19. Aunque diversos polimorfismos han sido vinculados al desarrollo de la EC, aún no se ha

podido establecer una participación clara de estas variantes en la patogénesis de la enfermedad (Babron *et al.*, 2003; Van Belzen *et al.*, 2003).

### **1.3.2. Factor ambiental: El gluten**

Se sabe que los síntomas de la EC se desencadenan por la ingesta de gluten en la dieta. Estrictamente hablando el gluten se puede definir como la masa de la harina de trigo que queda una vez que se han eliminado los componentes solubles en agua. Dependiendo de cómo se realice el lavado, el sólido obtenido contendrá entre un 75-85% de proteínas y un 5-10% de lípidos además de algunos hidratos de carbono que son insolubles en agua (Wieser, 2007).

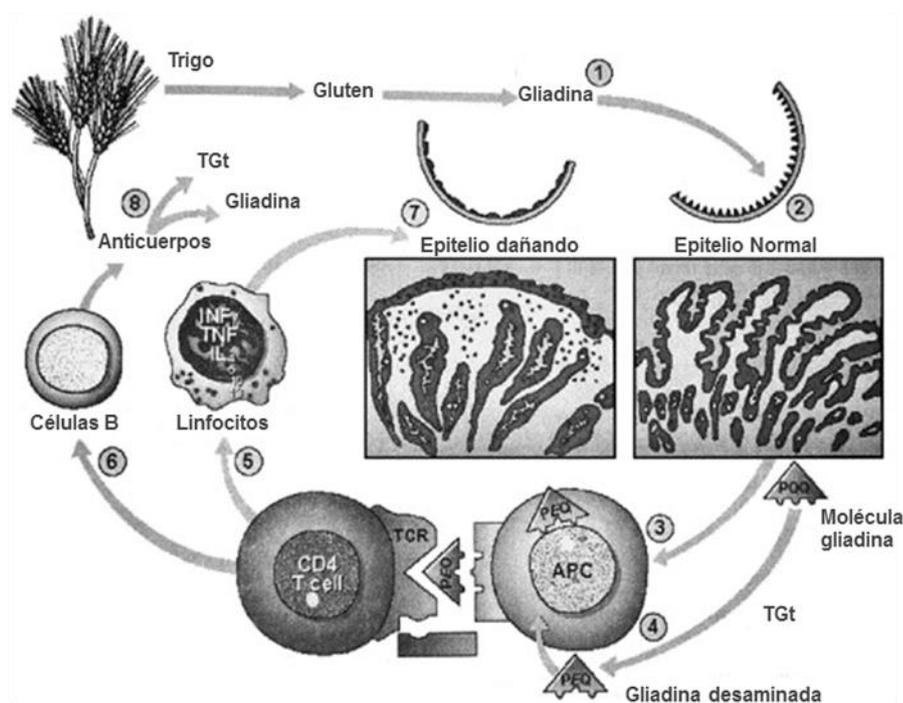
Las proteínas que forman parte del gluten, en función de su solubilidad en soluciones hidroalcohólicas, se dividen en gliadinas (solubles en etanol al 60%) y gluteninas (insolubles en etanol al 60%) (McGough & Cummings, 2005). En base a su secuencia N-terminal, tamaño y movilidad electroforética, las gliadinas a su vez se subdividen en  $\alpha/\beta$ -gliadinas,  $\gamma$ -gliadinas, y  $\omega$ -gliadinas. Las gluteninas, por el contrario se encuentran formando agregados de bajo peso molecular (LMW) y agregados de alto peso molecular (HMW) (Wieser, 2007).

A las gliadinas también se les conoce como prolaminas debido a su alto contenido en los aminoácidos prolina y glutamina. Estas proteínas se han considerado como el principal factor desencadenante de la EC (Van de Kamer *et al.*, 1953). Encontramos proteínas similares a las gliadinas en otros cereales como pueden ser la cebada, centeno y avena que se denominan hordeínas, secalinas y aveninas respectivamente (Wieser, 2007).

### **1.3.3. Mecanismos inmunológicos**

El desarrollo de las lesiones intestinales propias de la EC tiene una base autoinmune, caracterizada por la aparición de autoanticuerpos y la activación de linfocitos de la lámina propia intestinal (Alaedini & Green, 2005). Los péptidos del gluten debido a su alto contenido en glutamina y prolamina, son resistentes a la proteólisis completa por las enzimas gástricas y pancreáticas. Estos péptidos parcialmente digeridos consiguen alcanzar la lámina propia. Los péptidos como por ejemplo el péptido 33-mer, son sustrato de la enzima transglutaminasa tisular (TGt), (Arranz & Garrote, 2009). Esta enzima lleva a cabo la desaminación de los péptidos generando epítomos potencialmente inmunogénicos. Los epítomos desaminados son luego presentados, en asociación con los antígenos leucocitarios humanos DQ2 y DQ8 de las células presentadoras de antígeno, a las células T CD4<sup>+</sup>. Esta

activación traerá consigo la activación de las células B productoras de anticuerpos anti-gliadina y anti-TGt, además de la producción de distintas moléculas que serán responsables del daño intestinal (Kagnoff, 2007) (Figura 2).



**Fig.2.** Mecanismo inmunogénico de la EC. (1) Digestión incompleta del gluten. (2) Acumulación de fragmentos ricos en Pro y Gln; aumento de la permeabilidad de la mucosa. (3) Activación APCs y las células T CD4<sup>+</sup>. (4) Desaminación de la gliadina por la transglutaminasa tisular (TGt). (5) Activación de los linfocitos intraepiteliales (6) Activación de las células B (7) Efecto directo sobre el epitelio. (8) Liberación de anticuerpos anti-gliadina y anti-TGt.

## 1.4. Tratamiento

El único tratamiento para la EC, hasta el momento, es llevar a cabo una dieta libre de gluten durante toda la vida del paciente, lo cual le permitirá la recuperación de la mucosa intestinal (da Silva Neves *et al.*, 2010). Sin embargo, llevar a cabo una dieta completamente libre de gluten es difícil por varias razones: la naturaleza ubicua de estas proteínas, la contaminación cruzada de los alimentos y el etiquetado inadecuado de los mismos (Chand & Mihas, 2006). Además, los alimentos sin gluten tienen un elevado coste y sus propiedades organolépticas no son tan buenas como sus equivalentes con gluten. En la actualidad se están llevando a cabo nuevos tratamientos, que en un futuro podrían ayudar a mejorar la calidad de vida de estos pacientes (Sollid & Khosla, 2011).

## 2. MICROBIOTA INTESTINAL

### 2.1. Composición y distribución en el tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino (Guarner & Malagelada, 2003; Ley *et al.*, 2006). El término “microbiota” hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado. El ecosistema microbiano del tracto gastrointestinal incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie de microorganismos que transitan temporalmente por el tubo digestivo (Guarner & Malagelada, 2003). Las bacterias nativas se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, mientras que las bacterias en tránsito se ingieren continuamente a través de los alimentos, bebidas, etc.

En el cuerpo humano se estima que hay más células microbianas que células eucariotas ( $10^{14}$ : $10^{13}$ ) (Luckey, 1972). Eckburg *et al.* (2005), llevaron a cabo un estudio de la diversidad de la microbiota intestinal, y analizaron 13.355 secuencias del gen ARNr 16S procarionta a partir de muestras de tejido mucoso y muestras fecales de 3 individuos adultos sanos. Determinaron que el intestino aloja entre 300 y 500 especies de bacterias cultivables pertenecientes a más de 190 géneros. En ese mismo estudio determinaron que el 80% de las especies del intestino humano no habían sido cultivadas y el 60% eran especies nuevas que no habían sido descritas antes (Eckburg *et al.*, 2005).

La presencia específica de cada microorganismo, depende de las características fisiológicas y morfológicas de cada parte del aparato digestivo. La microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el tracto gastrointestinal. Así en el esófago, los grupos más frecuentemente encontrados pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella* (Pei *et al.*, 2004). El estómago (Tabla 1), como consecuencia de su pH ácido, tradicionalmente se ha considerado que presenta una carga bacteriana limitada. Sin embargo, Bik *et al.* (2006) determinaron mediante un análisis del ADNr 16S, la existencia de una comunidad más diversa a base de 128 filotipos. La mayoría de las secuencias fueron asignadas a los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* (Bik *et al.*, 2006; Dicksved *et al.*, 2009). Se ha destacado la presencia de *Helicobacter pylori*, como un miembro de la microbiota indígena del estómago,

que frecuentemente se le ha considerado como un microorganismo patógeno causante de enfermedades, pero también se ha demostrado que puede ejercer un posible papel protector sobre el huésped (Dorer *et al.*, 2009; Ciortescu & Stan, 2010; Ricci *et al.*, 2011).

La distribución de los microorganismos presentes en el intestino delgado es diferente a lo largo de éste, de modo que la concentración de bacterias va aumentando desde  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC)/g de contenido intestinal en el duodeno proximal, hasta alcanzar la concentración de  $10^7$  UFC/g de contenido intestinal en el íleon terminal (Rastall, 2004).

Se han llevado a cabo pocos estudios sobre la microbiota del intestino delgado, debido a que se trata de una zona de difícil acceso para la toma de muestras. La mayoría de los estudios obtenidos a partir de muestras del lumen o de la mucosa del duodeno han determinado la presencia de bajas concentraciones de bacterias, como consecuencia de su pH ácido, los movimientos peristálticos, y la secreción de jugos pancreáticos y biliares. Los primeros estudios que analizaron la microbiota duodenal, consideraron que la parte alta del intestino delgado era estéril o tenía una población muy dispersa, en la que predominaban microorganismos Gram-positivos (Shiner *et al.*, 1963; Challacombe *et al.*, 1974; Omoike & Abiodun, 1989). La mayoría de los microorganismos aislados son especies ácido-tolerantes (principalmente *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp.) derivadas de las cavidades orales y nasales. Sin embargo, también se han aislado, aunque en menor proporción (Tabla 1) *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Veillonella* spp., *Staphylococcus* spp., enterobacterias y levaduras (Wilson, 2005).

El número de bacterias a lo largo del yeyuno y el íleon aumenta progresivamente, desde alrededor de  $10^4$  UFC/g en el yeyuno hasta  $10^7$  UFC/g de contenido intestinal en el extremo del íleon, con un predominio de microorganismos aerobios Gram-negativos y algunos anaerobios obligados (Guarner, 2007). Wang *et al.* (2003), mediante la construcción de colecciones de clones del ADNr 16S, mostraron la presencia de *Bacteroidetes* y *Clostridium* (clústers XIVa y XI), como las especies dominantes en biopsias procedentes de la mucosa del íleon. En un estudio posterior, determinaron que el grupo *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (principalmente los estreptococos) y representantes del filo *Proteobacteria*, aparecían frecuentemente en biopsias procedentes del yeyuno (Wang *et al.*, 2005) (Tabla 1).



Estómago	10 <sup>4</sup> UFC/g de contenido intestinal	<i>Candida albicans</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>
Duodeno	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> UFC/g de contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> <i>Candida albicans</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>
Yeyuno	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> UFC/g de contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> <i>Candida albicans</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Bacillus</i>
Íleon	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> UFC/g de contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Veillonella</i>
Colon	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup> UFC/g de contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> <i>Bacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Eubacterium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Streptococcus</i>

**Tabla.1** Microorganismos predominantes en el tracto humano gastrointestinal

La mayor concentración de bacterias se encuentra en el intestino grueso, los recuentos de bacterias alcanzan densidades de alrededor de 10<sup>11</sup> UFC/g de contenido luminal. Los factores que facilitan el desarrollo bacteriano son la elevación del pH, próximo a la neutralidad, la disminución de la concentración de sales biliares y de restos de secreción pancreática. Además, en el colón el tiempo de tránsito es lento lo que brinda a los microorganismos la oportunidad de proliferar fermentando los sustratos disponibles derivados de la dieta o de las secreciones endógenas (Guarner, 2007; Zhu *et al.*, 2011).

En el colon existe un ambiente reductor, desprovisto de oxígeno, por lo que la mayoría de las poblaciones son anaerobias estrictas. Dentro de esta microbiota, el género *Bacteroides* (constituído por bacilos Gram-negativos no esporulados) es uno de los más abundantes (Tannock, 1995). También son dominantes otros microorganismos Gram-positivos no esporulados pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* (Conway, 1995). Los bacilos Gram-positivos esporulados están

representados fundamentalmente por el género *Clostridium*. En menor proporción, aparecen poblaciones de bacterias anaerobias facultativas o aerotolerantes como enterobacterias, enterococos, lactobacilos y estreptococos, que son esenciales para la homeostasis microbiana en el intestino grueso (Hagiage, 1993; Holzapfel *et al.*, 1998; Wilson, 2005).

## 2.2. Evolución de la microbiota intestinal

La adquisición de la microbiota intestinal comienza en el momento del nacimiento y se va consolidando a lo largo de la vida del individuo. El feto y el recién nacido se consideran libres de bacterias (Mackie *et al.*, 1999; Hooper & Gordon, 2001). Sin embargo, se encuentran pequeñas cantidades de microorganismos inmediatamente después del nacimiento (de  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  UFC/g de heces) y las bacterias frecuentemente aisladas son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium*. Bajo circunstancias normales, la colonización inicial del intestino del niño ocurre durante el parto al ponerse en contacto con la microbiota vaginal de su madre y posteriormente por el contacto con la microbiota normal de sus padres. Esto lleva a la inoculación con bifidobacterias, enterobacterias, bacteroides, *Clostridium* y cocos Gram-positivos (Bjorksten *et al.*, 2001; Vaishampayan *et al.*, 2010).

La leche materna es uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato, ya que garantiza un aporte continuo de bacterias durante todo el periodo de lactancia (Martín *et al.*, 2003; Le Huerou-Luron *et al.*, 2010). De hecho, posiblemente se trate de la principal fuente de bacterias para el recién nacido, ya que se estima que un lactante que ingiera aproximadamente 800 mL de leche al día recibe entre  $10^5$  y  $10^7$  bacterias (Heikkila & Saris, 2003). Por lo tanto, no es de extrañar que la microbiota intestinal del lactante refleje la existente en la leche materna. Los grupos bacterianos más frecuentemente aislados son estafilococos, estreptococos, corinebacterias, lactobacilos, micrococos, propionibacterias y bifidobacterias (Collado *et al.*, 2009a).

Al nacer, el ambiente en el intestino del niño muestra un potencial redox positivo, que permite la colonización inicial por *E. coli* y *Streptococcus* que a veces alcanzan cifras de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC/g de heces. Estas bacterias a su vez disminuyen ese potencial y permiten el establecimiento de microorganismos anaerobios estrictos pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium* entre los 4 y 7 días de vida (Thompson-Chagoyan *et al.*, 2007).

Así mismo, el tipo de nacimiento tiene un efecto significativo en el desarrollo de la microbiota intestinal:

- a) Nacimiento vaginal: normalmente la colonización se inicia durante el parto por exposición a la microbiota de la madre. Se han encontrado más de 18 grupos diferentes de bacterias en el tracto gastrointestinal inferior de la mujer embarazada y esas son las principales bacterias a las que está expuesto el recién nacido, siendo *E. coli* y *Streptococcus* las que con más frecuencia se aíslan del tracto digestivo del niño (Mackie *et al.*, 1999).

En los neonatos las bacterias aparecen en las heces durante el primer día de vida, siendo las primeras *E. coli*, *Streptococcus* y *Enterococcus* spp; las bifidobacterias aparecen alrededor del tercer día de vida extrauterina. Hacia el décimo día postnatal, la mayoría de los neonatos sanos a término están colonizados por una microbiota bacteriana heterogénea, en donde predomina *Bifidobacterium* en los alimentados con leche materna y una microbiota mixta en los que reciben leche de fórmula (Walker & Duffy, 1998).

- b) Nacimiento por cesárea: estos niños inician la vida prácticamente sin bacterias. El primer contacto con ellas es fortuito y los microorganismos son introducidos del ambiente por el equipo hospitalario (Walker & Duffy, 1998). Después del nacimiento los microorganismos ambientales, orales y cutáneos pueden ser transferidos de la madre al recién nacido por varios mecanismos tales como la lactancia y el cuidado materno (Mackie *et al.*, 1999). En estos niños la colonización por microorganismos anaerobios está generalmente retardada y la microbiota está compuesta por bacterias microaerófilas, anaerobios facultativos y bacterias esporuladas (*Clostridium*). Se produce un retraso en la colonización por bifidobacterias y *E. coli*. Entre los días 4 y 6, todos los niños nacidos por vía vaginal son colonizados por bacterias anaerobias, pero sólo el 9% de los nacidos por cesárea tienen estas bacterias (Klessen *et al.*, 2000).

Durante el primer mes de vida del neonato, los microorganismos que aparecen en mayor proporción en el intestino son bifidobacterias y *E. coli*, en menor proporción aparecen bacterias Gram-positivas de los géneros *Lactobacillus* y *Bacteroides* (Figura 3). Al cabo de un año, el número de bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Clostridium* se empieza a incrementar, y por el contrario se observa una reducción en la proporción de bifidobacterias y *E. coli*. En este estado, la microbiota intestinal del niño

empieza a parecerse a la del adulto y los principales grupos bacterianos aislados son *Staphylococcus aureus* (4%), *S. epidermidis* (20%), *Enterococcus faecalis* (30%), *Enterococcus faecium* (10%), estreptococos no hemolíticos (10%) y *Enterobacteriaceae* [*E. coli* (20%), *Klebsiella aerogenes* (20%), *Proteus mirabilis* (2%), *Enterobacter cloacae* (1%) y *Serratia sp.* (1%)] y *Pseudomonas aeruginosa* (0,5%). Las bacterias anaerobias facultativas son seguidas de cerca por *Bifidobacterium sp.* (Walker & Duffy, 1998).

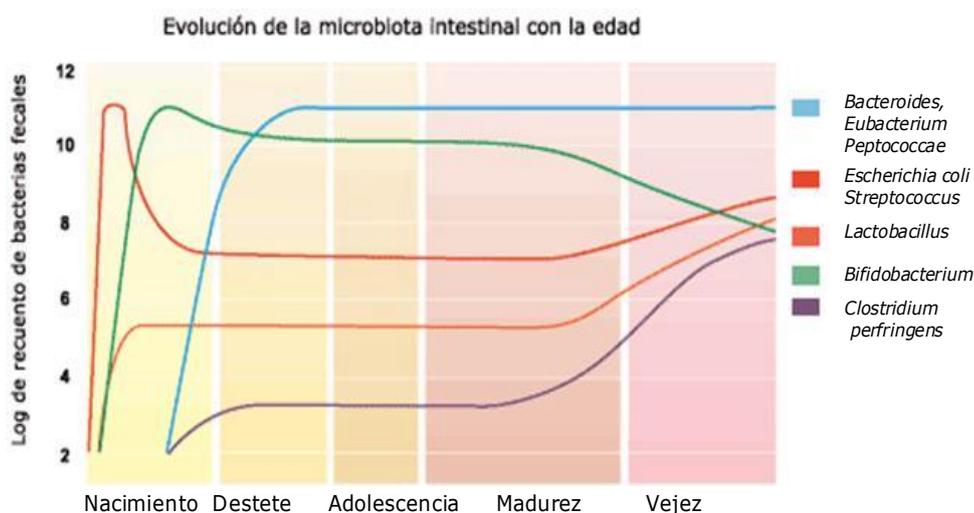


Figura 3. Evolución de la microbiota intestinal con la edad.

La composición de la microbiota intestinal está profundamente influenciada por la dieta del bebé. La introducción de la comida sólida coincide con el cambio cualitativo principal en la microbiota intestinal. Es en este momento cuando la microbiota comensal del niño se estabiliza y se asemeja a la microbiota presente en el adulto (Zoetendal *et al.*, 1998; Tannock, 2005).

A pesar de esta estabilidad de la microbiota del adulto, existen diferentes factores tanto intrínsecos como extrínsecos que van a modular tanto la cantidad como la calidad de la microbiota a lo largo de la vida del individuo (Tannock, 1983; Mitsuoka, 1992; Klessen *et al.*, 2000; Swift *et al.*, 2000; Zoetendal *et al.*, 2001). Varios estudios han determinado que el número de clostridios va aumentando con la edad, mientras que la proporción de bifidobacterias disminuye (Figura 3). En la senectud es frecuente el aislamiento de *Clostridium perfringens* y aparecen mayores niveles de mohos y enterobacterias en

comparación con la microbiota de individuos jóvenes (Mitsuoka, 1992; Hopkins *et al.*, 2001).

### **2.3. Factores modificadores de la microbiota intestinal**

Aunque se considera que se alcanza una microbiota estable, y similar a la del adulto, una vez finalizado el período de lactancia y tras iniciarse de manera continuada una alimentación sólida, existen numerosos factores que modulan y condicionan tanto la cantidad como la calidad de la microbiota comensal del adulto, pudiendo ésta variar sensiblemente a lo largo de toda la vida del individuo. Entre todos estos factores modificadores encontramos aspectos propios del individuo, tanto intrínsecos como extrínsecos, y otros factores propios de la microbiota intestinal.

#### **2.3.1. Factores microbianos**

Uno de los factores condicionantes de la microbiota del adulto, son las características de las bacterias comensales pioneras en ocupar las mucosas, ya que éstas, determinarán en gran manera las poblaciones resultantes en el adulto (Ducluzeau, 1993). Éstas vendrán determinadas básicamente por el tipo de parto (natural o por cesárea) (Huurre *et al.*, 2008) así como por el tipo de alimentación que éste reciba (fórmula o leche materna) (Le Huerou-Luron *et al.*, 2010). Las bacterias pioneras pueden modular el ecosistema inicial, determinando así la posibilidad de colonización o no de nuevos miembros bacterianos en lo que se denomina interacciones microbianas. La actividad metabólica de estas cepas iniciales puede alterar las condiciones del ecosistema a nivel de pH, oxígeno, etc., o generar metabolitos que pueden favorecer el crecimiento de otras especies (nutrientes, factores de crecimiento, etc.) o, por el contrario, competir por ellos o incluso generar sustancias que impidan el crecimiento de otras especies bacterianas como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, etc (Xaus, 2004).

Otro aspecto importante a la hora de determinar si una especie bacteriana será capaz de ocupar su nicho dentro de la microbiota ya establecida, son las características propias de esa bacteria, como por ejemplo la capacidad de adhesión al epitelio intestinal, la resistencia a las condiciones específicas de la mucosa a colonizar, la capacidad de movilidad o de esporulación de dicha especie bacteriana, su capacidad fermentativa, el tiempo de generación, etc., criterios que se intentan seleccionar a nivel industrial para la búsqueda de

los denominados probióticos para permitir así el establecimiento de la bacteria en una microbiota ya madura (Xaus, 2004; Zhu *et al.*, 2011).

## **2.3.2. Factores propios del individuo**

### 2.3.2.1. Factores intrínsecos

Entre los factores intrínsecos del individuo encontramos aquéllos que hacen referencia a la producción de ácidos estomacales, secreciones pancreáticas y sales biliares, que van a determinar, en definitiva, las condiciones de pH a nivel de las mucosas; la producción de enzimas hidrolíticas, como lisozima y tripsina; la producción de sustancias antimicrobianas propias como defensinas; la motilidad intestinal, la producción de mucus y de secreciones vaginales, que van a determinar las condiciones del hábitat que debe ser colonizado.

Otro factor intrínseco importante es la edad del individuo ya que ésta determinará, en gran medida, muchas de las actividades metabólicas y de las características de los factores determinados anteriormente (Enck *et al.*, 2009; O'Toole & Claesson, 2010; Biagi *et al.*, 2011).

### 2.3.2.2. Factores extrínsecos

Los factores extrínsecos del huésped son quizás los que suponen una mayor incidencia sobre la composición de la microbiota intestinal. Entre ellos destacan la dieta y el historial clínico del individuo.

La composición de la dieta va a determinar la cantidad de alimento no digerido que puede llegar a nivel intestinal y así condicionar el crecimiento y sobre todo las actividades metabólicas de diversas poblaciones bacterianas específicas (Finegold *et al.*, 1974; Finegold *et al.*, 1983a). Dentro de la dieta debemos incluir el uso de los prebióticos y probióticos, como alternativa para la modificación, de manera preventiva o terapéutica, de la composición de la microbiota comensal (Kleessen *et al.*, 1997; Parracho *et al.*, 2007).

Otro factor extrínseco altamente determinante es el historial clínico del individuo, especialmente en referencia al uso de antibióticos de manera generalizada; el padecimiento de enfermedades neoplásicas o autoinmunes que requieran el uso de tratamientos quimio o radioterapéuticos o el uso de inmunosupresores de manera crónica; o el padecimiento de patologías intestinales que hayan requerido de intervenciones quirúrgicas o que supongan una modificación clara de los hábitos intestinales. Todos estos factores tienen, sin duda, un

efecto relevante sobre la microbiota comensal (Xaus, 2004; Kinross *et al.*, 2009; Antunes & Finlay, 2011; Morotomi *et al.*, 2011).

Finalmente, otros aspectos como la temperatura y el clima, la actividad física, la contaminación ambiental o el estrés pueden afectar sensiblemente a la composición de la microbiota intestinal (Mackie *et al.*, 1999).

## **2.4. Funciones de la microbiota intestinal**

El cuerpo humano coexiste prácticamente desde el nacimiento con las comunidades bacterianas que se encuentran en todas las mucosas y epitelios comunicados con el exterior. La mayoría de estos microorganismos viven en el intestino, donde interactúan con el resto de células y sustancias que allí se encuentran. Esta relación se suele describir como comensal (una parte se beneficia mientras que la otra aparentemente no se ve afectada) pero, en realidad, es de mutualismo (ambas partes se benefician) (Backhed *et al.*, 2005).

Numerosas investigaciones con modelos animales gnotobióticos (criados en condiciones de asepsia total) han puesto de manifiesto que la microbiota comensal, y en especial aquella que reside en el tracto gastrointestinal, ejerce una influencia vital en el correcto desarrollo bioquímico y fisiológico del organismo que colonizan (Gordon & Pesti, 1971). Entre las funciones importantes para el hospedador en las que interviene la microbiota intestinal, deben incluirse no solo la metabólica y la protectora, sino también otras menos conocidas como la de contribuir a la maduración del tracto gastrointestinal, la de regular la angiogénesis y la deposición de grasa entre otras (Stappenbeck *et al.*, 2002; Hooper, 2004; Backhed *et al.*, 2005; Neu *et al.*, 2007).

### **2.4.1. Funciones metabólicas**

El metabolismo microbiano es responsable de la conversión de muchas sustancias en nutrientes que pueden ser absorbidos y utilizados por el huésped (Hooper *et al.*, 2002). La diversidad genética de la microbiota intestinal produce diversas enzimas y rutas bioquímicas que son distintas a las que se encuentran en el huésped, permitiendo así la recuperación de parte de la energía ingerida con la comida.

La microbiota presente en el colon fermenta carbohidratos de origen vegetal que no son digeridos por nuestras enzimas digestivas. Los productos metabólicos más importantes son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico

(Laparra & Sanz, 2010). Los AGCC constituyen la fuente energética principal de las células del epitelio intestinal en el colon y participan en el control de varios procesos metabólicos. El ácido butírico es, en su mayor parte, metabolizado en el epitelio intestinal, constituyendo la fuente energética principal para el epitelio del colon (Neish, 2009). Por otro lado, el acético y el propiónico acceden a la circulación portal y participan en el metabolismo del colesterol y los lípidos (Laparra & Sanz, 2010). Se ha descrito, que el ácido propiónico disminuye la expresión de enzimas lipogénicas en el hígado, implicadas en la síntesis de *novo* de triglicéridos y ácidos grasos, y reduce los niveles de colesterol (Hosseini *et al.*, 2011). Por el contrario, el acético reduce los niveles séricos de ácidos grasos, aunque aumenta los de colesterol (Teitelbaum & Walker, 2002). Se considera que globalmente la microbiota intestinal beneficiosa puede contribuir a reducir la colesterolemia mediante su capacidad para modular el equilibrio y composición entre estos AGCC.

Los AGCC favorecen también la absorción de minerales (calcio, magnesio y hierro) clínicamente relevantes para el tratamiento y prevención de ciertas enfermedades como la osteoporosis y la anemia. Esta absorción se produce como consecuencia de la reducción del pH luminal que aumenta la solubilidad de los minerales y favorece su entrada por difusión pasiva (Teitelbaum & Walker, 2002). Las funciones metabólicas también incluyen la producción de vitaminas (K, B<sub>12</sub>, biotina, ácido fólico y pantoténico) y la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea (Hooper *et al.*, 2002).

Sin embargo, de la actividad metabólica de la microbiota intestinal se desprenden también algunas actividades potencialmente dañinas para el organismo. Así, el metabolismo anaeróbico de los péptidos y proteínas a nivel del intestino, a pesar de que también producen AGCC, genera una serie de sustancias potencialmente tóxicas como amonio, aminos, fenoles, tioles e indoles (Macfarlane *et al.*, 1986; Hooper *et al.*, 2002).

Además, la dieta contiene, junto a los nutrientes, sustancias como aditivos, fármacos, contaminantes, etc, que pueden ser absorbidas y llegar al hígado a través de la circulación sanguínea, donde son detoxificados por procesos de oxidación y conjugación. La mayoría de las sustancias extrañas son eliminadas por la orina pero otras moléculas son excretadas vía bilis, por lo que vuelven al lumen intestinal donde se encuentran con la microbiota presente en el intestino; estas sustancias pueden ser desconjugadas permitiendo así su vuelta al torrente sanguíneo (van der Waaij, 1992).

### **2.4.2. Funciones tróficas**

La principal función de los AGCC es su efecto trófico sobre el epitelio intestinal, regulando tanto los procesos mecánicos, como los fenómenos de proliferación y diferenciación epitelial. Aunque los tres AGCC principales pueden estimular la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal, es el butirato quien juega un papel principal (Frankel *et al.*, 1994). Además, el butirato se ha asociado a la regulación de los procesos neoplásicos intestinales por su capacidad de inhibir la proliferación de las células cancerosas intestinales (Gibson *et al.*, 1992). Por otro lado, el acetato es también utilizado por los músculos esquelético y cardíaco para obtener energía y por los adipocitos para la lipogénesis (Hooper *et al.*, 2002).

La producción de determinados metabolitos, y la regulación de la cantidad de electrolitos, a nivel del bolo fecal, por parte de las bacterias comensales juega también un papel clave en el contenido de agua y volumen de las heces, en la secreción de neuropéptidos reguladores de la motilidad intestinal, y en definitiva, de la velocidad de tránsito intestinal (Xaus, 2004).

### **2.4.3. Funciones de protección**

Quizás una de las funciones más relevantes de las bacterias comensales es la regulación y estabilización del ecosistema, tanto intestinal como del resto de las mucosas, evitando la colonización por parte de otros microorganismos patógenos. Existe un fenómeno de competición no sólo por el espacio sino también por los nutrientes disponibles entre los microorganismos ya instaurados y los microorganismos patógenos. Pero además, la microbiota da lugar a unas condiciones de pH, producción de bacteriocinas, etc., que dificultan de forma importante la colonización por un elemento extraño a la microbiota normal (Lievin *et al.*, 2000; Chow *et al.*, 2010). En definitiva, la microbiota comensal constituye una primera barrera de defensa frente a las infecciones.

Pero, sin duda, la influencia de la microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmunitario es la función objeto de un gran número de investigaciones. En primer lugar, el establecimiento de la microbiota intestinal determina el desarrollo del sistema inmunitario (Gronlund *et al.*, 2000), actuando como un regulador esencial de las respuestas inmunitarias (Noverr & Huffnagle, 2004). Los estudios con animales gnotobióticos han demostrado que estos animales presentan un gran número de alteraciones en el sistema inmunitario, como

por ejemplo una bajada en la densidad de células linfoides en la mucosa intestinal, estructuras foliculares linfocitarias pequeñas y una baja concentración de inmunoglobulinas circulantes en la sangre (Butler *et al.*, 2000; Tannock, 2001). La inmadurez del sistema inmunitario de estos animales, demuestra que la microbiota intestinal podría actuar como un estímulo inmunogénico importante permitiendo la maduración del tejido linfoide asociado al tejido intestinal (Shroff *et al.*, 1995; Helgeland *et al.*, 1996). Dicha hipótesis queda demostrada cuando se induce experimentalmente la colonización bacteriana en estos animales y se comprueba la recuperación de la mayoría de los parámetros inmunitarios afectados por la ausencia de microorganismos. La introducción de una sola especie bacteriana en el intestino induce grandes cambios en la expresión génica de las células epiteliales y de la mucosa intestinal (Hooper & Gordon, 2001). Así, por ejemplo, algunas bacterias intestinales comensales estimulan la aparición de células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas A en la lámina propia de animales axénicos. Además, la capacidad de producir inmunoglobulinas A va aumentando a medida que se regenera la compleja microbiota intestinal (Moreau *et al.*, 1978; Shroff *et al.*, 1995).

### **3. MICROBIOTA INTESTINAL Y ENFERMEDAD**

La microbiota intestinal tiene gran importancia médica, ya que las bacterias pueden influir de forma beneficiosa o dañina sobre la salud del hospedador. Algunas especies de la microbiota intestinal han sido empleadas como probióticos para proporcionar efectos favorables para la salud humana (Fuller, 1991). En cambio, entre los posibles efectos perjudiciales, la microbiota del tracto gastrointestinal se ha asociado a la patogénesis de enfermedades crónicas inflamatorias intestinales (EII), cáncer de colon y otros desórdenes inmunes asociados (Greer & O'Keefe, 2011; Sobhani *et al.*, 2011; Stephani *et al.*, 2011).

En condiciones normales, el ecosistema intestinal está en equilibrio y los microorganismos perjudiciales no ejercen su efecto patogénico; sin embargo, en determinadas situaciones, éstos pueden dar lugar a infecciones y enfermedades si se establecen en regiones del cuerpo en las que no son residentes habituales o cuando su número se incrementa de forma excesiva debido a perturbaciones del ecosistema intestinal. Se ha descrito que pacientes con EII presentan un desequilibrio entre la proporción de bacterias potencialmente protectoras (como por ejemplo *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp) y bacterias potencialmente dañinas (ejemplo *Bacteroides* spp y enterobacterias) (Swidsinski *et al.*, 2002). Este desequilibrio en la microbiota intestinal se conoce como

disbiosis intestinal y también ha sido descrita en pacientes con EC (Nadal *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2009b).

### **3.1. Enfermedad celiaca y microbiota del intestino delgado**

Además del gluten, otros factores ambientales podrían estar asociados con el desarrollo o la patogénesis de la EC. Se planteó la posibilidad de que el hongo dimórfico *Candida albicans* podría ser un factor desencadenante de la EC, ya que este hongo presenta una proteína de pared de hifa (HWP1), en cuya secuencia de aminoácidos se encuentran regiones muy similares a las secuencias de aminoácidos de los epitopos tóxicos presentes en las  $\alpha$ -gliadinas y  $\gamma$ -gliadinas (Nieuwenhuizen *et al.*, 2003). También, se planteó el papel de determinados agentes infecciosos en el desarrollo de la EC. Los rotavirus son una de las causas más frecuentes de infecciones gatrointestinales en niños y son capaces de inducir procesos inflamatorios, cambios estructurales en el intestino y un aumento de la permeabilidad intestinal. Stene *et al.* (2006), encontraron una relación entre la alta frecuencia de infecciones causadas por rotavirus y un incremento en el riesgo de desarrollar la EC en niños predispuestos genéticamente.

Sin embargo, Forsberg *et al.* (2004), determinaron mediante microscopia electrónica la presencia de una bacteria de morfología bacilar anclada en la parte alta del intestino delgado en niños con EC, la cual no aparecía en individuos sanos. Este estudio sugirió por primera vez el posible papel de las bacterias en la patogénesis de la EC (Sollid & Gray, 2004). Como consecuencia, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la composición de la microbiota intestinal en enfermos celíacos. La mayoría de los trabajos para determinar el papel de las bacterias en la EC se han llevado a cabo en niños. Aunque la EC ha sido tradicionalmente considerada una enfermedad que se desarrolla durante los primeros años de vida, varios estudios han determinado rangos de prevalencia similar en adultos (Vivas *et al.*, 2008).

#### **3.1.1. Microbiota fecal**

Tjellström *et al.* (2005), llevaron a cabo a partir de heces, un estudio comparativo de la actividad metabólica de la microbiota intestinal entre niños con EC y niños sanos. Sus resultados determinaron que los niños con EC, independientemente de la dieta, presentaban un patrón diferente de ácidos grasos de cadena corta con respecto a los individuos sanos. En estudios posteriores, determinaron también que familiares de primer grado de niños con EC

presentaban una actividad metabólica diferente en comparación a la de individuos sanos (Tjellström *et al.*, 2007).

Asimismo, el análisis de muestras fecales de niños empleando varias técnicas moleculares han establecido diferencias en la composición de la microbiota fecal entre niños con EC y niños sanos. Mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), Collado *et al.* (2007), determinaron que el número de bacterias pertenecientes al grupo *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium histolyticum*, *Eubacterium rectale-C. coccoides*, *Atopobium* y bacterias reductoras de sulfato fue significativamente más alto en muestras fecales de niños con EC. Por el contrario, en los individuos sanos aparecían en mayor proporción microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium*. Por otro lado, mediante electroforesis en gradiente desnaturante (DGGE) empleando cebadores universales se determinó que la diversidad de la microbiota fecal de niños con EC era significativamente mayor que la de niños sanos (Sanz *et al.*, 2007a).

### 3.1.2. Microbiota duodenal

Se ha descrito que la microbiota presente en el yeyuno, íleon y colon difiere de la microbiota fecal (Wang *et al.*, 2005), por este motivo resultó necesario llevar a cabo una caracterización de la microbiota duodenal de pacientes celíacos (tratados y no tratados) y de individuos sanos. Los primeros ensayos realizados manifestaron una mayor proporción de bacterias Gram-negativas y bacterias pro-inflamatorias en la microbiota duodenal de niños con EC (Nadal *et al.*, 2007). Posteriormente, Collado *et al.* (2007), mediante PCR a tiempo real determinaron que dos poblaciones de bacterias asociadas al tracto gastrointestinal (*Bacteroides* sp. y *Clostridium leptum*), fueron significativamente más abundantes en niños con EC (tratados y no tratados) que en niños sanos. También, establecieron que los niveles de poblaciones de *Escherichia coli* y *Staphylococcus* fueron significativamente más altos en biopsias duodenales de niños con EC no tratados con respecto a pacientes tratados o controles y además estas poblaciones parecen estar asociadas con la fase activa de la enfermedad. Por otro lado, bacterias del género *Bifidobacterium*, que son generalmente consideradas como microorganismos beneficiosos y son frecuentemente empleados como probióticos, fueron significativamente menos abundantes en niños con EC no tratados (Collado *et al.*, 2009b).

Las poblaciones bacterianas encontrados en biopsias de niños con EC fueron similares a las encontradas en las heces, indicando por tanto que la microbiota fecal refleja parcialmente la microbiota presente en el intestino delgado de pacientes con EC. Además, también concluyeron que este desequilibrio en la microbiota duodenal y fecal de niños con EC no tratados podía ser parcialmente restaurado después de llevar a cabo una dieta libre de gluten durante un período de larga duración (Collado *et al.*, 2009b).

En un estudio similar, llevado a cabo por Schippa *et al.* (2010), se analizó mediante electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE) la composición de la microbiota asociada a la mucosa duodenal de niños con EC (antes y después de la dieta libre de gluten) y de niños sanos. Los resultados mostraron un papel potencial de la microbiota duodenal en la patogénesis de la EC, ya que se observó un perfil de bandas característico que podría estar asociado a la enfermedad y una mayor diversidad en la mucosa duodenal de pacientes con EC. Además, los niños con EC presentaban perfiles electroforéticos diferentes mediante TTGE antes y después del tratamiento con la dieta libre de gluten.

Finalmente, Ou *et al.* (2009), llevaron a cabo una caracterización de la microbiota de la parte proximal del intestino delgado mediante la secuenciación de una región del ADNr 16S. A su vez, intentaron también identificar las bacterias de morfología bacilar que previamente habían sido detectadas en biopsias yeyunales de niños con EC (Forsberg *et al.*, 2004). No se encontraron diferencias significativas entre la microbiota duodenal de niños con EC y niños sanos. Por el contrario, sí que observaron diferencias entre la microbiota duodenal de biopsias que habían sido recogidas durante los últimos años (2004-2007) y las realizadas en torno a 1990, durante la epidemia de EC que había tenido lugar en Suecia. En estas últimas biopsias, en las que además de haber encontrado las bacterias de morfología bacilar mediante microscopía electrónica, se observó también una gran proporción de bacterias del género *Clostridium*, *Prevotella* y/o *Actinomyces graevenizii*, todas ellas de morfología bacilar (Ou *et al.*, 2009).

### **3.2. Enfermedades inflamatorias intestinales y microbiota intestinal**

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son un grupo de trastornos intestinales de origen desconocido. La mayor parte de los casos de EII se pueden clasificar como Colitis Ulcerosa (CU) o Enfermedad de Crohn (ECh) (Hendrickson *et al.*, 2002; Shanahan, 2002). Aunque la CU y la ECh se engloban dentro del grupo de EII, ambas ocasionan distintas formas de inflamación crónica en el tracto gastrointestinal. La ECh puede aparecer en

cualquier zona del tubo digestivo, siendo el íleon y el colon, las regiones más comúnmente afectadas. En cambio, la CU afecta exclusivamente a la mucosa del intestino grueso (Sokol *et al.*, 2008). El íleon terminal y el intestino grueso son considerados lugares idóneos para la proliferación microbiana, ya que la motilidad intestinal es más lenta.

Las EII aparecen frecuentemente en adultos jóvenes, pero también pueden darse en niños. El pico de incidencia de edad está entre 10-40 años y afectan aproximadamente a 3,6 millones de personas en Europa y Norteamérica (Lopez-Serrano *et al.*, 2009).

Aunque el mecanismo patogénico no se conoce todavía, se sospecha que se trata de una combinación de varios factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles. Una de las hipótesis que se ha planteado, es que las EII se producen como consecuencia de una activación inadecuada del sistema inmune por la microbiota intestinal. Varios trabajos realizados a partir de modelos animales experimentales de EII, han demostrado que es necesaria la presencia de las bacterias para la iniciación y persistencia de la inflamación crónica, ya que en animales axénicos no se desarrolla la enfermedad (Dianda *et al.*, 1997; Pizarro *et al.*, 2000; Sartor, 2006).

Existe cierta controversia en establecer que microorganismos son los responsables de la inflamación. Algunos investigadores han planteado que los microorganismos responsables de las EII podrían ser patógenos, como por ejemplo *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Hermon-Taylor, 2001; Greenstein, 2003; Sartor, 2005), puesto que dicho microorganismo se ha detectado frecuentemente asociado a la mucosa de pacientes con ECh. Por el contrario, otros estudios han mostrado diferencias en la composición de la microbiota entre pacientes con EII e individuos sanos (Swidsinski *et al.*, 2002; Guarner & Malagelada, 2003; Marteau *et al.*, 2004). Como consecuencia de esas diferencias, se produce un desequilibrio entre especies de bacterias consideradas como protectoras y bacterias dañinas, dando lugar al fenómeno que se conoce como disbiosis intestinal (Frank *et al.*, 2007).

### **3.2.1. Enfermedad de Crohn y microbiota fecal**

Una variedad de métodos moleculares han sido empleados para analizar la composición de la microbiota fecal de pacientes con EII con respecto a individuos control. Los resultados de estas técnicas han señalado una reducción de la diversidad microbiana en pacientes con ECh en comparación a los individuos sanos. En concreto, se ve disminuida la diversidad de bacterias del filo *Firmicutes*, y particularmente de los miembros del grupo clostridial IV

(subgrupo *Clostridium leptum*). Este grupo filogenético, contiene varias bacterias productoras de butirato, como por ejemplo *Faecalibacterium prausnitzii* (Barcenilla *et al.*, 2000; Suau *et al.*, 2001). *F. prausnitzii* produce además de butirato, formiato y D-lactato, proporcionando una fuente de energía para las células epiteliales del colon. El butirato actúa como inhibidor de la expresión de citoquinas en la mucosa intestinal, y además refuerza la integridad de la barrera intestinal mediante la producción de mucina y péptidos antimicrobianos (Pryde *et al.*, 2002; Scheppach & Weiler, 2004). Li *et al.* (2008), demostraron que una disminución de *F. prausnitzii*, junto a la reducción de bacterias productoras de butirato, podría ocasionar la inflamación intestinal en individuos genéticamente susceptibles.

Por el contrario, existe un desacuerdo sobre si existen diferencias en las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos entre pacientes con ECh e individuos sanos. En algunos trabajos, han detectado una reducción en las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos en muestras fecales de individuos con ECh (Giaffer *et al.*, 1991; Favier *et al.*, 1997), pero la gran mayoría no encuentran diferencias significativas. Si que se han determinado diferencias cuantitativas en las poblaciones de enterobacterias, fundamentalmente de *Escherichia coli* en muestras fecales de pacientes con ECh con respecto a los controles sanos (Giaffer *et al.*, 1991; 1992; Seksik *et al.*, 2003). Existe controversia con respecto a los miembros del filo *Bacteroidetes*. En algunos estudios, se ha mostrado un descenso del grupo *Bacteroides* (Seksik *et al.*, 2003) o en otros del subgrupo *B. fragilis* (Scanlan *et al.*, 2006). Mientras otros autores, por el contrario han determinado un incremento en las poblaciones correspondientes al subgrupo *B. fragilis*, particularmente de *B. vulgatus* y otras especies afines (Ruseler-van Embden & Both-Patoir, 1983; Mangin *et al.*, 2004).

En un estudio reciente de pirosecuenciación llevado a cabo por Willing *et al.* (2010), se destacó que los individuos con ECh presentaban una composición microbiana diferente a la de individuos sanos. Además, esa composición era específica en función de si la inflamación tenía lugar en el íleon o en el colon. Los pacientes con ECh localizada en el íleon (EChI), presentaban una reducción en el número de bacterias de *Faecalibacterium* y *Roseburia*, frente a un aumento en la proporción de *E. coli* y *Ruminococcus gnavus*. En cambio, se observó un incremento en la proporción de *Faecalibacterium* en las heces de pacientes con ECh localizada en el colon (EChC). Una de las observaciones más llamativas fue que los fenotipos de EChI y EChC mostraban perfiles bacterianos opuestos, concretamente en las

poblaciones de *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* y *Ruminococcaceae* (Willing *et al.*, 2010).

### **3.2.2. Enfermedad de Crohn y microbiota intestinal adherida a la superficie mucosa**

Al igual que en el análisis de la microbiota fecal, se ha descrito también una reducción en la diversidad de bacterias asociadas a biopsias en individuos con ECh (Ott *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2011). Esta disminución se ve reflejada en miembros del filo *Firmicutes* (Gophna *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2007), particularmente del subgrupo *Lachnospiraceae*. Varios estudios reflejaron al igual que ocurría en las heces, una reducción de la bacteria productora de butirato, *Faecalibacterium prausnitzii* en pacientes con ECh (Martínez-Medina *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2007; Vasquez *et al.*, 2007; Willing *et al.*, 2009). Sin embargo, otros autores determinaron que al igual que ocurría en las heces, *F. prausnitzii* aparecía en mayor proporción en biopsias procedentes del colon en individuos con ECh (Willing *et al.*, 2009).

También existe controversia en los resultados con relación a miembros del filo *Bacteroidetes*. Algunos autores, han indicado un incremento en la frecuencia de detección de este filo (Swidsinski *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2005), por ejemplo *Bacteroides fragilis* fue significativamente más abundante en pacientes con ECh que en sujetos sanos (Gophna *et al.*, 2006). Mientras que otros trabajos han determinado una reducción del número de bacterias de este filo (Frank *et al.*, 2007). Conte *et al.* (2006), detectaron una disminución en la concentración de *B. vulgatus* en niños con ECh. Esta reducción en el número de bacterias de *B. vulgatus* en la mucosa de pacientes que presentaban inflamación, corroboró las observaciones llevadas a cabo por Waidmann *et al.* (2003). Su investigación sugirió un posible papel protector de *B. vulgatus* frente a cepas de *E. coli* inductoras del proceso de inflamación en el colon.

Al igual que ocurría en las heces, los pacientes con ECh presentan un incremento en la concentración de enterobacterias (Swidsinski *et al.*, 2002; Martínez-Medina *et al.*, 2006; Kotlowski *et al.*, 2007) principalmente de *Escherichia coli* asociadas al grupo B2+D. Este grupo filogenético se caracteriza por presentar serin-proteasas autotransportadoras (un tipo de transportador específico que aparece únicamente en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y que está asociado a virulencia), así como factores de adhesión (adhesinas) a las células epiteliales (Kotlowski *et al.*, 2007). Además, estas cepas de *E. coli*

fueron comúnmente encontradas en la mucosa del íleon y no en el colon de pacientes con ECh (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Willing *et al.*, 2009). Este hecho, se asocia a una reducción de la producción de butirato por *F. prausnitzii* en el íleon, lo que ocasiona al mismo tiempo una disminución en la liberación de péptidos antimicrobianos, facilitando así la proliferación de cepas de *E. coli* patogénicas (Baumgart *et al.*, 2007).

Puesto que la ECh se caracteriza por su condición de inflamación crónica, muchos investigadores han especulado que un agente infeccioso podría ser el causante de la ECh. Durante mucho tiempo *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) se ha asociado a la patogénesis de la ECh, ya que se ha detectado mediante diferentes técnicas moleculares asociado frecuentemente a la mucosa de pacientes con ECh y por el contrario, no se ha detectado prácticamente en individuos sanos (Schwartz *et al.*, 2000; Sechi *et al.*, 2001; Bull *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2004). Todos estos estudios realizados, confirman que existe una relación entre MAP y la ECh, pero el papel patogénico de MAP en el intestino permanece incierto.

### **3.2.3. Colitis ulcerosa y microbiota fecal**

Se han llevado a cabo pocos estudios sobre la microbiota fecal de pacientes con Colitis Ulcerosa (CU). Al igual que en la Enfermedad de Crohn, la composición de la microbiota fecal de pacientes con CU muestra una reducción de la diversidad (principalmente en el filo *Firmicutes*) en comparación con individuos sanos (Sokol *et al.*, 2006a; Andoh *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008; Noor *et al.*, 2010).

En un estudio llevado a cabo por Bullock *et al.* (2004), se determinó que cuando se comparan muestras fecales de pacientes con CU durante la fase activa y durante la fase de remisión de la enfermedad, el número de especies del género *Lactobacillus* era significativamente menor durante la fase activa. Por otro lado, también se ha observado una notable reducción en la proporción de bacterias del grupo *Clostridium coccooides* en muestras fecales de pacientes con CU con respecto a los individuos control (Sokol *et al.*, 2006b).

Al igual que ocurre en la ECh, *Escherichia coli* también aparece frecuentemente asociada a muestras de pacientes con CU. Sokol *et al.* (2006a), llevaron a cabo un estudio basado en el contenido de ARNr para analizar la diversidad de bacterias activas de la microbiota fecal de pacientes con CU. Determinaron mediante electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE), que *E. coli* aparece en mayor proporción en la microbiota

activa de pacientes con CU que en la de individuos control. Este hecho volvió a plantear de nuevo el papel patogénico de *E. coli* en las EII.

Por otro lado, se ha descrito también un incremento en la concentración de bacterias reductoras de sulfato en muestras fecales de pacientes con CU activa con respecto a pacientes que se encuentran en la fase de remisión (Pitcher *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2007). El sulfuro de hidrógeno, es el principal producto del metabolismo de las bacterias reductoras de sulfato. Se ha descrito que este compuesto a altas concentraciones inhibe la oxidación del butirato, que es la principal fuente de energía de los colonocitos. Este aumento de la concentración de bacterias reductoras de sulfato se ha asociado a la patogénesis de la CU, puesto que se ha detectado un incremento en la concentración de sulfuro de hidrógeno en las heces de pacientes con CU (Chapman *et al.*, 1994; Rowan *et al.*, 2009).

Recientemente, Noor *et al.* (2010), mediante electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE), han determinado una reducción en el número de especies del género *Bacteroides* en pacientes con CU. En varios estudios, se ha determinado que especies como *Bacteroides vulgatus* o *B. ovatus* podrían llevar a cabo un papel protector frente al proceso inflamatorio que tiene lugar en las EII (Waidmann *et al.*, 2003; Hudcovic *et al.*, 2009). Ambas especies, se ha descrito que aparecen en menor proporción en pacientes con colitis ulcerosa (Conte *et al.*, 2006; Takaishi *et al.*, 2008), por lo que se ha asociado esa reducción en el número de *Bacteroides*, con la pérdida de un posible papel protector por parte de este grupo de bacterias (Noor *et al.*, 2010).

#### **3.2.4. Colitis ulcerosa y microbiota intestinal adherida a la superficie mucosa**

También se ha descrito una disminución en la diversidad de la microbiota adherida a la mucosa en pacientes con CU en comparación a individuos sanos (Ott *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2011). En general, se ha determinado que no existen diferencias en cuanto a las bacterias adheridas a la mucosa de tejidos inflamados y no inflamados en pacientes con CU (Bibiloni *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2007), aunque Zhang *et al.* (2007), si observaron cambios en determinadas poblaciones. Sus resultados, mediante DGGE, reflejaron que la diversidad bacteriana de especies pertenecientes al género *Lactobacillus* y al subgrupo de *Clostridium leptum* estaba disminuida en tejidos ulcerados en comparación a tejidos sin ulceración dentro del mismo paciente con CU. En un estudio reciente llevado a cabo por Walker *et al.* (2011), se observaron también diferencias significativas entre la microbiota adherida a zonas inflamadas o no inflamadas de la mucosa. Sin embargo, vieron que estas diferencias varían

entre individuos, por lo que no se podía asociar una población específica a la inflamación intestinal. En la Tabla 2 aparece una comparación entre la composición de la microbiota intestinal de pacientes con ECh y de pacientes con CU.

Enfermedad de Crohn		Colitis ulcerosa
Características especiales	Características comunes	Características especiales
	Descenso global de la diversidad microbiana	
	Disminución de bacterias pertenecientes al filo <i>Firmicutes</i>	
Disminución del grupo <i>Clostridium leptum</i> y en particular de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		Disminución en el grupo <i>C. coccoides</i>
	Disminución en el número de lactobacilos y bifidobacterias	
	Incremento en el número de Enterobacterias	
	Incremento en la concentración del grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> B2+D	
	Conflicto en los datos referentes a <i>Bacteroidetes</i>	
Frecuentemente se detecta <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>		Incremento en el número de bacterias reductoras de sulfato

**Tabla 2.** Comparación de la microbiota intestinal entre pacientes con CU y pacientes con ECh.

Hay varios estudios que al analizar la microbiota adherida a la mucosa rectal, destacan una disminución en el número total de bifidobacterias en pacientes con CU (tanto en estado activo como en fase de remisión) en comparación a individuos sanos (Macfarlane *et al.*, 2004; Macfarlane *et al.*, 2005; Mylonaki *et al.*, 2005). En cambio, la gran mayoría de los autores han determinado un incremento en la concentración de enterobacterias

(principalmente *Escherichia coli* perteneciente al grupo B2+D) asociadas a la mucosa de pacientes con CU frente a individuos sanos (Swidsinski *et al.*, 2002; Mylonaki *et al.*, 2005; Kotlowski *et al.*, 2007). Sin embargo, Sasaki *et al.* (2007), establecieron que las cepas de *E. coli* aisladas a partir de pacientes con CU eran menos invasivas que las aisladas a partir de la mucosa de pacientes con ECh.

Finalmente, al igual que ocurría en la ECh, también existe controversia con respecto al filo *Bacteroidetes*. Varios trabajos han resaltado un incremento en bacterias pertenecientes a este filo (Swidsinski *et al.*, 2005; Lucke *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2011). Por el contrario, otros autores han determinado una disminución del número de miembros del filo *Bacteroidetes* con respecto a individuos control (Ott *et al.*, 2004; Conte *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2007).

#### **4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

Durante décadas, el estudio de la microbiota bacteriana que forman parte del ecosistema intestinal se ha realizado a través de técnicas de cultivo. El uso de estas técnicas de cultivo supone un coste reducido. Además, permite la cuantificación de poblaciones bacterianas y la posibilidad de llevar a cabo estudios bioquímicos y fisiológicos a partir de las cepas aisladas. A pesar de estas ventajas, estas técnicas clásicas presentan también inconvenientes, como por ejemplo que son muy laboriosas y requieren mucho tiempo. Además, las muestras requieren ser procesadas inmediatamente y los resultados obtenidos están enormemente afectados por el tipo de medio y las condiciones de crecimiento (Furrie, 2006). El análisis directo mediante recuento microscópico suele ser complementario para controlar la eficacia de la metodología de cultivo. Sin embargo, presenta el inconveniente de que no proporciona información de la diversidad microbiana y los recuentos pueden también infravalorarse por la presencia de artefactos en las preparaciones.

Debido a las dificultades en el crecimiento y caracterización de la microbiota intestinal, su estudio ha sido también abordado a través de la cuantificación de los metabolitos y las actividades enzimáticas bacterianas. Se pueden estudiar metabolitos como los ácidos grasos volátiles o productos del metabolismo de los ácidos biliares mediante técnicas cromatográficas, o actividades enzimáticas de origen microbiano como las glicosidasas o las reductasas. Estos métodos de estudio presentan el inconveniente de que muchas actividades enzimáticas no son específicas de un microorganismo o de un grupo bacteriano concreto; por lo que no pueden utilizarse como métodos únicos de identificación.

La aparición de las técnicas moleculares ha ocasionado un cambio profundo, permitiendo la identificación de microorganismos no cultivados y establecer entre ellos relaciones filogenéticas (Zoetendal *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 2000; Favier *et al.*, 2002; Zoetendal *et al.*, 2004). El ADN ribosomal como marcador filogenético se empezó a utilizar en los años 70 (Fox *et al.*, 1977) y su aplicación en la clasificación taxonómica y la Ecología Microbiana ha aumentado exponencialmente. El ADNr 16S es el marcador molecular más empleado, ya que está presente en todas las bacterias, se detecta con facilidad, y se caracteriza por contener regiones conservadas y variables, especialmente útiles para el estudio de la diversidad microbiana (Woese, 1987). Además, se ha desarrollado una base de datos con las secuencias de un amplísimo número de microorganismos procedentes de los ecosistemas más variados (McCartney *et al.*, 1996; Zoetendal *et al.*, 2001).

Sin embargo, la utilización del gen ADNr 16S tiene una serie de limitaciones como la presencia de múltiples operones con pequeñas variaciones en su secuencia en algunas bacterias, lo que puede generar una sobreestimación del número de bacterias presentes en las comunidades naturales (Nubel *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 1998). Por estos motivos, en algunos casos es necesario utilizar otros marcadores genéticos como las giraras (Kasai *et al.*, 1998), la región del espaciador intergénico 16S-23S del ADNr (Haarman & Knol, 2006) o las chaperonas (Dumonceaux *et al.*, 2006).

Algunas de las técnicas moleculares más empleadas hasta el momento para el estudio de la microbiota intestinal se describen a continuación.

#### **4.1.FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)**

Esta técnica permite identificar específicamente microorganismos y además cuantificarlos. Se trata de una hibridación ADN-ARN, en la que se utilizan sondas de ADN de unos 18 nucleótidos que tienen su diana en el ARNr 16S (Amman, 1995). Las sondas se marcan convenientemente con un fluorocromo en el extremo 5'. Las células en las que se establezca la hibridación, van a poder ser detectadas al microscopio de fluorescencia utilizando el filtro adecuado o por citometría de flujo. Dadas las características de las moléculas del ARN ribosómico, se pueden diseñar sondas basándose en las zonas conservadas al nivel de dominio, de modo que nos permitan identificar y cuantificar las células pertenecientes al dominio *Bacteria* o *Archaea*, en un ecosistema concreto. También se pueden diseñar sondas más específicas a nivel de orden, de género, especie e incluso de

poblaciones dentro de una misma especie. De este modo, se pueden identificar y cuantificar con precisión los microorganismos presentes en un sistema (Amman *et al.*, 1995).

Su principal limitación es que no existen sondas específicas para todos los géneros y especies bacterianas, y su diseño no es sencillo. Además, para usar esta técnica, es preciso tener un conocimiento previo de las secuencias de los microorganismos que componen un sistema, por lo que es conveniente combinarla con otras técnicas de Ecología Microbiana (Manz *et al.*, 1992).

Esta metodología se ha empleado en la observación de las variaciones de la microbiota intestinal por consumo de medicamentos y probióticos (Brunser *et al.*, 2006) o la detección de *Clostridium* en niños (Fallani *et al.*, 2006). Para determinar diferencias en la microbiota fecal entre niños alimentados con leche materna y niños alimentados con leche de fórmula (Bezirtzoglou *et al.*, 2011). En muchas ocasiones se puede complementar con citometría de flujo (Collado *et al.*, 2007; Nadal *et al.*, 2007; De Palma *et al.*, 2010) obteniéndose resultados similares con ambas técnicas (Zoetendal *et al.*, 2002).

## **4.2. Colección de clones del ARNr 16S**

En los últimos años, la combinación de la PCR con la clonación de los fragmentos resultantes y la posterior secuenciación de los mismos, ha permitido un acceso directo a la diversidad filogenética bacteriana existente dentro de comunidades complejas. El empleo de cebadores universales, posibilita la amplificación simultánea de fragmentos del ADNr 16S de prácticamente cualquier microorganismo presente en una muestra sin necesidad de cultivarlo. Seguidamente, los distintos productos de PCR se clonan para formar una librería que incluya todos los fragmentos posibles, los cuales se pueden secuenciar y comparar con las secuencias depositadas en las bases de datos (Altschul *et al.*, 1997).

Este método permite un estudio taxonómico muy preciso, gracias a la obtención de árboles filogenéticos de gran resolución. Cubre la gran mayoría de los microorganismos, incluyendo aquellos grupos minoritarios, y permite la identificación de microorganismos, que aún no han sido cultivados. Sin embargo, esta técnica no cuantitativa presenta varios inconvenientes. Supone un coste económico alto y requieren de un personal especializado, ya que se trata de una técnica larga y compleja. Además, es necesario secuenciar un alto número de clones para asegurar que la mayoría de las especies se han detectado.

Esta técnica se ha empleado para caracterizar la microbiota del intestino delgado presente en niños con EC (Ou *et al.*, 2009) o para determinar diferencias entre la microbiota intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn y con colitis ulcerosa (Gophna *et al.*, 2006) entre otros.

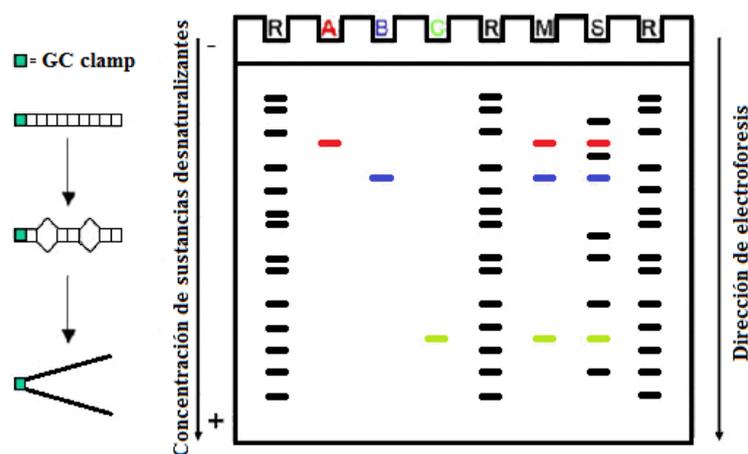
### **4.3. Técnicas basadas en análisis de perfiles electroforéticos**

#### **4.3.1 DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)**

La electroforesis en geles de gradiente desnaturante (DGGE) permite separar moléculas de ADN de doble hebra de igual tamaño, según su temperatura de fusión ( $T_m$ ), lo que está directamente relacionado con su secuencia (Fischer & Lerman, 1979; 1983; Myers *et al.*, 1987). Se trata de geles de acrilamida con un gradiente creciente de urea-formamida. Como en una electroforesis convencional, las moléculas de ADN corren hacia el polo positivo, pero cada molécula se va a detener cuando la concentración de urea-formamida sea suficiente para producir su desnaturalización, de modo que al cambiar su estructura y dejar de ser soluble no podrá seguir avanzando entre los poros de la acrilamida. Las moléculas de ADN que se analicen por este sistema deben llevar adheridas en uno de sus extremos una secuencia rica en los nucleótidos G y C (*GC-clamp*) idéntica para todas ellas. De este modo, cuando las moléculas se desnaturalicen por efecto del gradiente, no llegarán a separarse totalmente las dos hebras y se detendrán (Figura 4). Esta metodología se aplicó en sus orígenes a estudios de mutaciones puntuales en genes humanos productoras de patologías (Myers *et al.*, 1987; Borresen *et al.*, 1988) ya que la técnica es capaz de separar moléculas de ADN que se diferencian en un solo nucleótido.

La DGGE se utilizó por primera vez en Ecología Molecular, para el estudio de la población microbiana de sistemas tan complejos como tapetes y biopelículas por Muyzer *et al.* (1993). Para ello, se realizó la extracción del ADN genómico presente en las muestras. A partir de dicho ADN se procedió a la amplificación parcial de los genes de ARNr 16S con cebadores universales del dominio *Bacteria*. Los cebadores con los que se llevó a cabo la amplificación poseían en su extremo 5' una secuencia rica en GC de unos 50 nucleótidos (*GC-clamp*). De este modo, los fragmentos de los genes de ARNr 16S de secuencias distintas resultantes podían ser separados y analizados por DGGE. Como resultado de la reacción de amplificación se obtuvo la mezcla de los genes del ARNr 16S de todas las

bacterias presentes en la muestra. Estos genes fueron separados mediante la DGGE. El resultado fue un patrón de bandas, donde cada banda correspondía al gen del ARNr 16S de un miembro de la población bacteriana (Figura 4). El número total de bandas era igual al número de componentes de dicha población.



**Figura 4.** Comportamiento del ADN de doble hebra en contacto con los agentes desnaturalizantes del gel. R: Perfil de referencia; A: Microorganismo 1; B: Microorganismo 2; C: Microorganismo 3; M y S: Muestras polimicrobianas procedentes de diferentes orígenes.

Las aplicaciones de la técnica de PCR-DGGE son muy variadas, y entre ellas se ha estudiado la modificación de la microbiota intestinal tras la ingesta de antibióticos (McCracken *et al.*, 2001; Donskey *et al.*, 2003; Maccaferri *et al.*, 2010), la dinámica de colonización bacteriana del tracto gastrointestinal en neonatos (Favier *et al.*, 2002; Pozuelo *et al.*, 2005), la diversidad bacteriana en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales o con enfermedad celiaca (Bibiloni *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2007a; Di Cagno *et al.*, 2009; Noor *et al.*, 2010), los efectos de la incorporación de probióticos en la ingesta de humanos y animales (Temmerman *et al.*, 2003; Tannock *et al.*, 2004; Montesi *et al.*, 2005; Garcia-Albiach *et al.*, 2008) entre otros.

La técnica de TGGE es similar al DGGE, pero el gradiente desnaturalizante se sustituye por un gradiente de temperatura en el gel (Rosenbaum & Riesner, 1987; Muyzer & Smalla, 1998). Ambas técnicas (DGGE y TGGE), han facilitado el estudio de comunidades bacterianas pero también presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, en la práctica únicamente permiten la detección de bacterias que se encuentren en concentraciones

superiores al 1% en la comunidad microbiana (Muyzer *et al.*, 1993; Zoetendal *et al.*, 1998) y, por lo tanto, sólo las bacterias dominantes están representadas. No obstante la utilización de cebadores específicos para determinados grupos o especies bacterianas puede aumentar notablemente el límite de detección. Gracias a estos cebadores específicos se han conseguido analizar poblaciones de bacterias minoritarias como son los lactobacilos en las heces (Walter *et al.*, 2001) o las bifidobacterias en el tracto gastrointestinal (Satokari *et al.*, 2001b). Otro problema que puede surgir al analizar la diversidad microbiana mediante el análisis del ADNr 16S, es la presencia en algunas bacterias de múltiples operones con pequeñas variaciones en su secuencia que conducen a una sobreestimación del número de bacterias presentes en las muestras (Nubel *et al.*, 1997; Satokari *et al.*, 2001a).

#### **4.3.2 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción**

Esta técnica se basa en el análisis de restricción de los fragmentos amplificados (no se corresponde con la técnica clásica de RFLP en la que se utiliza la hibridación con sondas marcadas), también se le conoce como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) cuando se amplifican secuencias de genes ribosomales 16S. Las secuencias de las diferentes especies presentan distintas dianas para enzimas de restricción, obteniéndose patrones de bandas de distinta longitud que pueden analizarse mediante electroforesis. De tal forma, que comunidades de bacterias diferentes darán lugar a patrones de bandas también diferentes.

El número de bandas obtenidas no indica el número de organismos diferentes, por lo que este método no permite obtener una medida de la diversidad real de la muestra. No obstante, es un método adecuado para el análisis exploratorio de las colecciones de clones previo a la secuenciación de los mismos. De esta forma evitamos secuenciar clones que presenten patrones de restricción repetidos.

Una modificación de los RFLP, es la técnica t-RFLP (*Terminal-Restriction-Fragment Length Polymorphism*). La diferencia radica en el empleo de cebadores marcados con fluorescencia en la PCR. Esto permitirá que una vez que se ha obtenido el perfil de bandas electroforéticas, y mediante excitación del compuesto fluorescente, se puedan identificar picos de fluorescencia que se correlacionarían con la abundancia de la secuencia. Esta técnica no permite la correlación entre cada pico y una especie de bacteria, ya que la separación de las bandas se realiza en función del tamaño de la secuencia.

Este método se ha utilizado para el estudio de poblaciones de la microbiota intestinal (Fairchild *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005; Dinoto *et al.*, 2006; Dicksved *et al.*, 2008).

#### **4.4. PCR cuantitativa (qPCR)**

La PCR a tiempo real es otra técnica cuantitativa, que se puede emplear en el estudio de la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal. Esta técnica se basa en la detección, en tiempo real de la amplificación de la PCR durante el desarrollo de cada ciclo, proporcionando un resultado en cada momento de tipo cuantitativo y una posterior interpretación y tratamiento estadístico. En cada ciclo, la señal aumenta exponencialmente pudiéndose comparar después con una recta de calibrado. Una de las principales ventajas de esta técnica, cuando se compara con otras técnicas cuantitativas como FISH, es que presenta un incremento en la precisión numérica (Gueimonde *et al.*, 2004).

Para la detección de los productos de qPCR se pueden emplear diferentes sistemas de marcaje con fluorescencia, como las sondas *Taqman*, los cebadores *scorpions*, las moléculas fluorescentes (*molecular beacons*), diversos fluoróforos específicos de ADN bicatenario como el SYBR Green I o cebadores fluorogénicos. Las sondas *Taqman* y el SYBR Green I son los sistemas más utilizados para cuantificar las diferentes variaciones cuantitativas en géneros bacterianos como *Lactobacillus* (De Palma *et al.*, 2009), variaciones bacterianas por consumo de probióticos (Rochet *et al.*, 2006; Lyra *et al.*, 2010), el estudio de la microbiota intestinal (Matsuki *et al.*, 2004; Mariat *et al.*, 2009), estudio de enfermedades del tracto gastrointestinal (Rinttila *et al.*, 2004; Collado *et al.*, 2008; Ponnusamy *et al.*, 2011) y las variaciones ecológicas ambientales (Liu *et al.*, 2007).

#### **4.5. Metagenómica**

La metagenómica es una nueva aplicación de la Biología Molecular, que permite el estudio desde un punto de vista genómico de comunidades microbianas, a partir de ADN genómico extraído de muestras sin que hayan sido cultivadas en el laboratorio. El primer análisis metagenómico fue llevado a cabo en 1985 por Pace *et al.*, que determinaron la diversidad microbiana mediante clonación del ADN extraído directamente de muestras ambientales complejas, pero pronto restricciones tecnológicas pusieron límite a los avances en este área. Recientemente, el desarrollo y abaratamiento de las tecnologías de secuenciación masiva como la pirosecuenciación (454 *Life Sciences*) o el método *Shotgut*

han permitido llevar a cabo la secuenciación de grandes cantidades de ADN. Sin embargo, la longitud de las secuencias que estas tecnologías producen es muy pequeña en comparación con los métodos tradicionales de secuenciación (*Sanger*). Esto supone un enorme problema cuando se intentan ensamblar las secuencias obtenidas, para así reconstruir secuencias lineales completas (*contigs*) y, con un poco de suerte, la secuencia lineal completa del cromosoma. Por tanto, cabe señalar que el esfuerzo computacional que requiere este análisis es enorme y, aunque se han observado avances, el ensamblaje automático dista mucho de ser perfecto y frecuentemente requiere la asistencia humana (Petrosino *et al.*, 2009).

Las ventajas principales de la metagenómica sobre las técnicas tradicionales de amplificación genética, son un menor sesgo taxonómico en la secuenciación, y la capacidad de analizar simultáneamente una misma comunidad desde un punto de vista taxonómico y funcional. Los estudios metagenómicos no sólo proporcionan una imagen de la composición de la microbiota intestinal, sino que también dan a conocer determinadas rutas metabólicas, como por ejemplo la síntesis de antibióticos o la biosíntesis de vitaminas (Rondon *et al.*, 2000; Entcheva *et al.*, 2001), así como el descubrimiento de biocatalizadores como por ejemplo genes lipolíticos y enzimas degradadoras/modificadoras de polisacáridos (Rondon *et al.*, 2000). En los últimos años, numerosas investigaciones han centrado su atención en el análisis metagenómico de la microbiota intestinal humana (Eckburg *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Gosalbes *et al.*, 2011).

# **OBJETIVOS**

---



La presencia de una bacteria de morfología bacilar anclada en la parte alta del intestino delgado de niños con EC, que no aparecía en individuos sanos, planteó por primera vez el posible papel de las bacterias en la patogénesis de la EC (Forsberg *et al.*, 2004). En los últimos años, se ha descrito también la existencia de diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición de la microbiota fecal y duodenal entre niños con EC e individuos control (Collado *et al.*, 2007; Nadal *et al.*, 2007; Sanz *et al.*, 2007a), así como diferencias en los metabolitos derivados de la actividad microbiana del intestino de pacientes con EC, familiares de primer grado e individuos no enfermos celíacos (Tjellstrom *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta todas estas evidencias científicas, nos planteamos llevar a cabo un estudio comparativo de la microbiota intestinal en individuos no celíacos frente a pacientes diagnosticados con EC.

Los objetivos que se plantearon al principio del trabajo fueron los siguientes:

- 1- Estudio y comparación de la microbiota del intestino delgado proximal en individuos sanos y pacientes enfermos celíacos, tanto en estado activo como tratados.
- 2- Comparar las variaciones de la microbiota tras el tratamiento de la enfermedad celíaca en estado activo.
- 3- Determinar la influencia de la edad en la composición de la microbiota, tanto en individuos sanos como en celíacos.
- 4- Evaluar la microbiota duodenal con actividad proteolítica frente al gluten de niños y adultos sanos, comparándola con pacientes enfermos celíacos, tanto activos como tratados.
- 5- Estudio y comparación de la microbiota fecal de individuos adultos, tanto de sanos como de pacientes enfermos celíacos activos y tratados.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

---



## **1. SUJETOS DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Se utilizaron muestras provenientes de tres tipos de individuos: pacientes controles no celíacos (No-EC), individuos celíacos activos (ECA) e individuos celíacos tratados (ECT) en dieta sin gluten (DSG).

Al diagnóstico, todos los pacientes celíacos presentaban datos clínicos compatibles con la enfermedad, como serología positiva (anticuerpos antitransglutaminasa), genética positiva (HLA-DQ2/DQ8), y alteraciones histológicas en la mucosa de la biopsia duodenal. Al momento de la recogida de la muestra, todos los pacientes ECA presentaban alteraciones de la mucosa y una serología positiva. Por el contrario, los pacientes en DSG presentaban recuperación de la lesión histológica (Marsh 1-0), además de serología negativa desde al menos un año. Las muestras biológicas utilizadas fueron de dos tipos: explantes de mucosa intestinal obtenidos por biopsia y muestras fecales.

En el caso de los individuos no enfermos celíacos, las muestras de biopsias duodenales fueron obtenidas de pacientes que fueron referidos a las consultas de gastroenterología debido a otras patologías intestinales (diarrea crónica, gastritis por *Helicobacter*, hernia de hiato, etc.). En todos los casos, el diagnóstico final fue de No-EC y en ningún caso presentaban alteraciones de la mucosa duodenal al momento de tomar la muestra. Las muestras fecales fueron obtenidas a partir de individuos voluntarios sanos que no presentaban enfermedades médicas, ni síntomas de enfermedades digestivas conocidas.

Ninguno de los individuos incluidos en el estudio, fue tratado con antibióticos durante al menos un mes antes de la toma de las muestras. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado tanto de los padres de los niños, como de los pacientes adultos incluidos en el estudio a la toma de muestras. Los protocolos de estudio fueron aprobados por la Comisión de Ética del Hospital de León.

### **1.1. Muestras duodenales**

Se recogieron biopsias duodenales de niños y adultos procedentes de los Servicios de Gastroenterología Adulta y Pediátrica del Hospital de León por el Dr. Santiago Vivas. Todas las muestras fueron extraídas mediante endoscopia alta con biopsia de la 2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> porción duodenal. Se almacenaron en una solución de suero salino a -80°C hasta su procesamiento. Para la construcción de las colecciones de clones de una región del ADN<sub>r</sub> 16S se incluyeron en el estudio: (1) 13 niños; 8 niños celíacos activos (ECA<sub>N</sub>) que llevaban a cabo una dieta

normal conteniendo gluten (rango de edad comprendido entre 1-10 años, la edad media fue de 3,75 años) y 5 niños control sanos no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>) sin ninguna intolerancia alimentaria conocida (rango de edad comprendido entre 3-12 años, la edad media fue de 7,2 años). (2) 15 individuos adultos; 5 adultos celíacos activos no tratados (ECA<sub>A</sub>) (rango de edad comprendido entre 26-38 años, edad media 31,4 años); 5 enfermos celíacos tratados en DSG (ECT<sub>A</sub>) (rango de edad comprendido entre 16-21 años, edad media 18,8 años) y 5 adultos control no celíacos (No-EC<sub>A</sub>) (rango de edad comprendido entre 15-40 años, edad media 29,2 años) (Anexo 1).

Los cultivos de la microbiota duodenal se realizaron sobre biopsias duodenales de 8 individuos adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), 3 biopsias duodenales obtenidas a partir de pacientes adultos enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>), 5 biopsias procedentes de enfermos adultos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>), 2 biopsias duodenales de niños no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>) y 6 biopsias duodenales de niños enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>) (Anexo 1). Todas estas muestras duodenales fueron diferentes a las empleadas en la construcción de las colecciones de clones de ADN<sub>r</sub> 16S. Aquí la muestra no fue congelada, sino que se procesó inmediatamente.

## 1.2. Muestras fecales

En el estudio se incluyeron muestras fecales de 11 sujetos sanos voluntarios (No-EC<sub>A</sub>) (rango de edad comprendido entre 24-42 años, edad media 30,9 años), 10 individuos adultos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) (rango de edad comprendido entre 13-60 años, edad media 38,5 años) y 11 pacientes adultos celíacos tratados en DSG (ECT<sub>A</sub>) (rango de edad comprendido entre 21-66 años, edad media 40,4 años) (Anexo 1). Todas las muestras fecales fueron homogenizadas, alicuotadas y congeladas a -80°C, en un tiempo no superior a 3 horas tras la defecación.

## 2. CEPAS BACTERIAS, VECTORES Y MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1. Cepas bacterianas

*StrataClone*<sup>™</sup> *SoloPack*<sup>®</sup> *Competent cells* (Stratagene). Cepa comercial de *Escherichia coli* utilizada en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Estas cepas son proporcionadas por el kit *StrataClone PCR Cloning* (Stratagene). Entre las características más destacables de estas cepas está la de presentar una

delección en el gen *Z* del operón *lac*, esto permite la selección por color de aquellos transformantes portadores de un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de dicha mutación. Además, son capaces de expresar la enzima *Cre* recombinasa y son resistentes a estreptomicina.

**Genotipo de esta cepa:** F<sup>-</sup>  $\phi$ 80dT1<sup>r</sup>T5<sup>f</sup> *Lac* $\Delta$ M15 *recA endA*.

## 2.2. Vectores

**pSC-A-amp/kan.** Son plásmidos comercializados por Stratagene. Presentan un tamaño de 4,3 kb. Sus características principales son:

- Contienen un fragmento del gen *LacZ* (subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa) capaz de complementar la mutación presente en la  $\beta$ -galactosidasa en algunas cepas de *E. coli* portadoras de la delección *Lac* $\Delta$ M15 (proceso denominado  $\alpha$ -complementación), permitiendo la selección de los transformantes en los que se ha integrado el plásmido por la aparición del color azul al incubarlos en presencia de X-gal.
- Además, estos plásmidos portan los genes de resistencia a la kanamicina y a la ampicilina.
- Poseen el origen de replicación monocatenario del fago f1.
- Presentan los sitios *loxP* que son reconocidos por la *Cre* recombinasa.
- Contienen el origen de replicación del pUC.

Este vector se comercializa como una mezcla de dos fragmentos de ADN, cada uno de los cuales presenta en uno de los extremos la Topoisomerasa I covalentemente unida al vector y una uridina terminal modificada (U\*); en el otro extremo contiene la secuencia *loxP*. Los productos de PCR originados por la *Taq* polimerasa, que contienen colas 3'-adenosina, son eficientemente ligados al vector en una reacción de ligación, a través de la unión A-U\*, seguida por la ligación de ambos brazos por la topoisomerasa I. La molécula lineal resultante (vector<sup>ori</sup>-producto de PCR-vector<sup>amp/kan</sup>) es transformada en el interior de células competentes capaces de expresar la *Cre* recombinasa. Esta enzima es capaz de reconocer los sitios *loxP* y llevar a cabo la recombinación de ambos, dando lugar a una molécula de ADN circular (pSC-A-amp/kan, Figura 1).

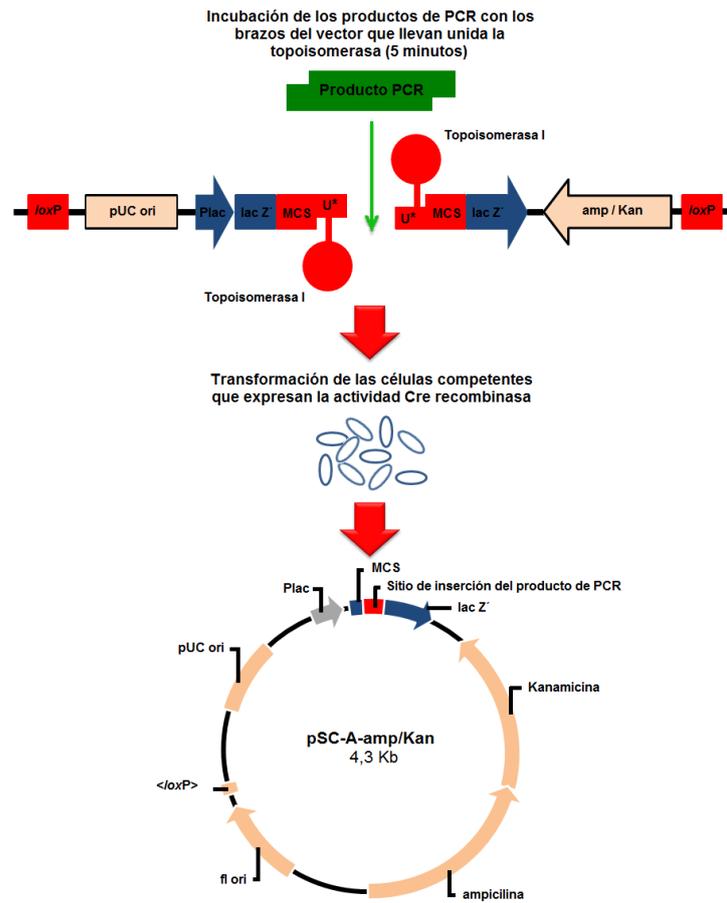


Figura 1. Mecanismo de acción del StrataClone PCR cloning (Stratagene)

## 2.3. Medios de cultivo

### 2.3.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

**Medio LB (Luria-Bertani)** (Miller, 1972). Se empleó como medio general para el crecimiento de *E. coli*. Composición:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada hasta 1 litro.	

Se ajustó el pH a un valor de 7,5 con NaOH 10M. Para su uso como medio sólido se añaden 20 g de agar por litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121° C.

**Medio TB (*Terrific Broth*)** (Maniatis *et al.*, 1982). Medio tamponado y enriquecido para la propagación de *E. coli*. Formulado específicamente para incrementar el rendimiento de ADN plasmídico obtenido de transformantes de *E. coli*.

Bactotripton	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL

Se añadió agua destilada hasta 900 mL. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121° C. Antes de su utilización, se mezcló con 100 mL de una solución estéril de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mM y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  720 mM.

### 2.3.2. Medios de cultivo empleados con microorganismos aislados a partir de biopsias duodenales

**MCB (medio de cultivo de biopsias)** (diseñado en nuestro laboratorio). Las cantidades vienen especificadas para 100 mL de medio.

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 %
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 %
$\text{CaCl}_2$	2 mM
$\text{ZnSO}_4$	2 mM
Glucosa	2 %
Tween 80	0,1 % (v/v)
$\text{FeCl}_3$	20 $\mu\text{M}$
Gluten	3 %
Digerido de gluten*	0,5 %
Agua destilada hasta 100 mL	

Presenta un pH de 6,5. Se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121°C. Para medio sólido se añadió agar al 1,5%.

\*Digerido de gluten 3% (100mL): 3 g de gluten se digieren con 1 g de pepsina a pH 2 ajustado con HCl 10M. La mezcla se incuba durante 2h a 37°C con agitación 250 rpm. Seguidamente se eleva el pH a 6,5 con NaOH 1M y posteriormente se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos.

**Medio TSB (*Tryptic Soy Broth*).** Se trata de un medio líquido compuesto por un digerido de soja y caseína utilizado para el cultivo de microorganismos.

Peptona de caseína	20 g
Peptona de soja	5 g
Glucosa	2,5 g
NaCl	6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Agua destiladahasta	1 litro
pH 7,5	

Para medio sólido se añadió agar al 2%

**Medio para el estudio de la actividad proteolítica.** Es un medio diseñado en nuestro laboratorio para medir la actividad proteolítica de los microorganismos aislados a partir del cultivo de biopsias, frente a diferentes sustratos proteicos. La medición de la actividad se llevo a cabo mediante bioensayo.

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 %
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
ZnSO <sub>4</sub>	2 mM
Glucosa	2 %
Tween 80	0,1 % (v/v)
Proteína*	3 %
Agua destilada hasta	100 mL
pH 6,5	

\*Proteína:

- Si la proteína es el gluten, el medio se denominó GluM (medio con gluten)
- Si la proteína es la gelatina, se le denominó GelM (medio con gelatina)
- Si la proteína es la caseína, se denominó CasM (medio con caseína)

### **3. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS**

#### **3.1. Cultivo y mantenimiento de *Escherichia coli***

Para el crecimiento de esta bacteria en medio sólido, se utilizó habitualmente el medio LB. El crecimiento en medio líquido se realizó tanto en medio LB como en medio TB. Incubándose a 37° C durante 24 h.

Las cepas de *E. coli* se conservaron a una temperatura de 4° C, en placas petri selladas con Parafilm® durante un mes como máximo. Para períodos más largos se prepararon suspensiones de las mismas con una concentración final de glicerol del 50% (v/v), que se conservaron a -80° C.

#### **3.2. Cultivo y mantenimiento de los microorganismos aislados a partir de biopsias duodenales**

Para el aislamiento de los microorganismos a partir del cultivo de biopsias se empleó el medio líquido MCB. La biopsia se inoculó en un matraz con 10 mL de medio de cultivo y se incubó durante 48 h a 37°C con agitación (100 rpm) en condiciones microóxicas. Para generar estas condiciones, se emplearon los sobres *CampyGen* (Oxoid) cuyo componente activo es el ácido ascórbico y una jarra de anaerobios (Sigma-Aldrich).

Transcurrido ese tiempo, se plaquearon diluciones seriadas del cultivo en placas que contenían medio MCB sólido. Como diluyente se empleó NaCl (0,9%). Después de incubar estas diluciones durante 48 h a 37°C en condiciones microóxicas, se aislaron varias colonias de cada morfología distinta. Seguidamente, se hicieron varios pases de cada uno de los aislamientos hasta obtener colonias aisladas, que posteriormente fueron identificadas molecularmente.

Las cepas aisladas se conservaron a una temperatura de 4° C, en placas petri selladas con Parafilm® durante un mes como máximo. O durante períodos más largos se almacenaron congeladas a una temperatura de -80°C, para ello se las creció en medio TSB o MCB líquido en condiciones microóxicas hasta alcanzar la fase estacionaria, se centrifugó y el pellet se resuspendió en 500 µL de glicerol al 50%.

## 4. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

### 4.1. Extracción de ADN de biopsias duodenales

Se siguió el protocolo de extracción del ADN genómico del Kit *NucleoSpin® Tissue XS* (Macherey-Nagel). Este kit está diseñado para el aislamiento eficiente de ADN genómico a partir de muestras de pequeño tamaño tales como tejidos, bacterias, restos de sangre, etc, ya que permite la elución en volúmenes muy pequeños (5-30  $\mu\text{L}$ ) dando lugar a un ADN altamente concentrado.

1. Se pesa la biopsia y se coloca en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Para un peso aproximado de 2,5 mg se añaden 80  $\mu\text{L}$  de tampón T1 y 8  $\mu\text{L}$  de proteinasa K.
2. Se incuba a 65°C (1-4 h) hasta que se lisen completamente las células. Durante la incubación, se mezcla con el vórtex varias veces.
3. Se añaden 80  $\mu\text{L}$  de tampón B3, se mezcla con el vórtex dos veces durante 5 segundos y la mezcla se incuba a 70°C durante 5 minutos.
4. Se añaden 80  $\mu\text{L}$  de etanol (96-100%) al lisado y se mezclan bien con el vórtex.
5. Cada muestra se transfiere a una columna *NucleoSpin® Tissue XS* y se centrifuga a 11.000 xg durante un minuto. Se desecha el sobrenadante que pasa a través de la columna y esta se coloca sobre un tubo nuevo de 2 mL.
6. A continuación se llevan a cabo una serie de lavados sobre la propia columna. Se añaden 50  $\mu\text{L}$  del tampón B5 sobre la membrana de la columna y se centrifuga durante un minuto a 11.000 xg. Se hace un segundo lavado añadiendo de nuevo 50  $\mu\text{L}$  de tampón B5 directamente sobre la membrana de la columna y esta vez se centrifuga durante 2 minutos a 11.000 xg.
7. Se coloca la columna sobre un tubo eppendorf nuevo de 1,5 mL y se añaden 30  $\mu\text{L}$  del tampón BE directamente sobre la membrana de la columna. Se centrifuga 1 minuto a 11.000 xg.
8. Se elimina la columna y en el tubo eppendorf queda el ADN que ya está preparado para ser utilizado en otras aplicaciones.
9. Se almacena el ADN congelado a -20°C.

## **4.2. Extracción de ADN genómico de cultivos bacterianos**

Se empleó el kit *SpeedTools Tissue DNA Extraction* (Biotools):

- 1- Se recuperan las células mediante centrifugación a 8.000 xg durante 5 minutos a partir de 1 mL de cultivo bacteriano.
- 2- El pellet se resuspende en 180  $\mu$ L de tampón BT1 pipeteando arriba y abajo. A continuación se añaden 25  $\mu$ L de proteinasa K. La muestra se mezcla con el vórtex de forma vigorosa y se incuba a 56°C hasta que se obtenga una lisis completa (1-3h). Se mezcla con el vórtex ocasionalmente durante el periodo de incubación. (Algunas cepas como las Gram-positivas son más difíciles de lisar. En estos casos se pre-incuba la muestra con enzimas líticas. Se resuspende el pellet en lugar de en el tampón BT en el siguiente tampón: 20mM Tris/HCl; 2 mM EDTA; 1% Tritón X-100; pH 8 suplementado con 20 mg/mL de lisozima. Se incuba a 37°C durante 30-60 minutos).
- 3- Se mezcla la muestra con el vórtex. Se añaden 200  $\mu$ L de tampón BB3 de lisis. Se mezcla de nuevo con el vórtex de forma vigorosa la muestra (10-20 segundos) y se incuba a 70°C durante 10 minutos. Se mezcla con el vórtex brevemente.
- 4- Se añaden 210  $\mu$ L de etanol (96-100%) al lisado y se mezcla bien usando el vórtex.
- 5- Se carga el lisado en una columna. Se centrifuga 1 minuto a 11.000 xg. Se deshecha el tubo con el filtrado.
- 6- Se llevan a cabo dos lavados de la membrana de sílica del filtro. Un primer lavado se añaden 500  $\mu$ L de tampón BBW. Se centrifuga 1 minuto a 11.000 xg. Se deshecha el tubo y el filtrado. El segundo lavado, se añaden 600  $\mu$ L de tampón BB5 y se centrifuga de nuevo 1 minuto a 11.000 xg. Se deshecha el tubo y el filtrado.
- 7- Se elimina el etanol residual, para ello se coloca la columna en un microtubo de 1,5 mL y se centrifuga durante 1 minuto a 11.000 xg.
- 8- Para la elución del ADN puro se añaden 100  $\mu$ L de tampón BBE precalentado a 70°C directamente en la membrana. Se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y seguidamente se centrifuga 1 minuto a 11.000 xg. El eluido contiene el ADN puro de la muestra.

### 4.3. Extracción de ADN de heces

Se siguió el protocolo de extracción del kit *QIAamp DNA Stool Mini* (Qiagen):

- 1- Se pesan entre 180-220 mg de heces en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y seguidamente se coloca el tubo en hielo.
- 2- Se añaden 1,4 mL del tampón ASL a cada muestra de heces. Se mezcla con el vórtex durante un 1 minuto o hasta que la muestra esté perfectamente homogeneizada.
- 3- Se calienta la suspensión durante 5 minutos a 70°C.
- 4- Se mezcla con el vórtex durante 15 segundos y a continuación se centrifuga la muestra a la máxima velocidad durante 1 minuto.
- 5- Se recupera el sobrenadante (aproximadamente 1,2 mL) y se coloca en un tubo nuevo de 2 mL y se descarta el pellet.
- 6- Se añade una pastilla *InhibitEX* proporcionada por el kit e inmediatamente se mezcla con el vórtex durante 1 minuto o hasta que la pastilla este completamente disuelta. Se incuba la suspensión durante 1 minuto a temperatura ambiente para permitir que los inhibidores sean absorbidos por la matriz del *InhibitEX*.
- 7- Se centrifuga a la máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar en el pellet los inhibidores presentes en las heces.
- 8- Se recupera el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se vuelve a centrifugar de nuevo durante 3 minutos.
- 9- Se añaden 15 µL de proteinasa K a 200 µL del sobrenadante obtenido en el paso anterior.
- 10- Se añaden 200 µL de tampón AL y se mezcla durante 15 segundos.
- 11- Se incuba a 70°C durante 10 minutos.
- 12- Se añaden 200 µL de etanol (96-100%) al lisado, y se mezcla con el vórtex.
- 13- Se transfiere todo el lisado a una columna de purificación proporcionada por el kit. Se centrifuga a la máxima velocidad durante 1 minuto. A continuación se coloca el filtro en una nueva columna y se descarta el tubo que contiene el filtrado.
- 14- Se añaden 500 µL de tampón AW1 y se centrifuga durante 1 minuto. De nuevo se coloca el filtro en una nueva columna.
- 15- Se añaden 500 µL de tampón AW2 y se centrifuga durante 3 minutos. Se descarta también el tubo conteniendo el filtrado.
- 16- Finalmente, se coloca el filtro en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Cuidadosamente sobre el filtro se depositan 200 µL de tampón AE directamente

sobre la membrana del filtro. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó durante 1 minuto el ADN eluido.

#### **4.4. Cuantificación de los ácidos nucleicos**

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó espectrofotométricamente. El ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Biocompare). Este sistema permite medir la concentración de ADN expresada en ng/μL a partir de un volumen de muestra de 1,5 μL. Al mismo tiempo mide los ratios de absorbancia entre 230/260 nm y 260/280 nm que permiten evaluar la pureza del ADN cuantificado.

En ocasiones, la cuantificación se hizo por electroforesis en geles de agarosa empleando marcadores de peso molecular de concentración conocida.

### **5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

#### **5.1. PCR**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un método simple y muy sencillo descrito inicialmente por Mullis & Faloona (1987), que permite la amplificación *in vitro* de fragmentos de ADN, en una serie de incubaciones a distintas temperaturas.

Mediante esta técnica, los fragmentos de ADN codificante para el ARNr 16S han sido amplificados utilizando la *rTaq* polimerasa (GE Healthcare) y un termociclador de Biometra, modelo TProfessional Gradient. Para ello se emplearon los cebadores universales F968 y R1401 para llevar a cabo la construcción de colecciones de clones y los cebadores 27F y E939R para la identificación molecular de los microorganismos aislados a partir del cultivo de biopsia (Tabla 1). Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron suministrados por Isogen Life Science.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
<b>27F</b>	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	912	42
<b>E939R</b>	CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC		
<b>F968</b>	GAACGCGAAGAACCTTAC	433	47
<b>R1401</b>	GGTGTGTAACAAGACCC		

**Tabla 1.** Descripción de los oligonucleótidos empleados para el ensayo de PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L. Los componentes y las concentraciones de los mismos empleadas en la reacción de PCR se muestran en la Tabla 2.

Componentes	Volumen	Concentración final
<b>10x PCR tampón</b>	2,5 $\mu$ L	1x
<b>10 mM dNTP mezcla</b>	0,5 $\mu$ L	0,2 mM de cada dNTP
<b>10 <math>\mu</math>M cebador directo</b>	0,25-2,5 $\mu$ L	0,1-1,0 $\mu$ M
<b>10 <math>\mu</math>M cebador reverso</b>	0,25-2,5 $\mu$ L	0,1-1,0 $\mu$ M
<b>DNA molde</b>	50 ng	Según sea necesario, <500 ng
<b>rTaq polimerasa (5 unidades/<math>\mu</math>L)</b>	0,2 $\mu$ L	0,04 unidades/ $\mu$ L
<b>Agua miliQ</b>	Hasta 25 $\mu$ L	NA

**Tabla 2.** Componentes y concentraciones para la reacción de PCR en un volumen final de 25  $\mu$ L empleando la enzima rTaq polimerasa.

La PCR se inició con una desnaturalización a 94°C durante 4 minutos, y a partir de aquí se llevaron a cabo 30 ciclos con las siguientes temperaturas: desnaturalización del ADN a 94°C durante 30 segundos, hibridación de las cadenas de ADN a 47°C o 42°C (Tabla 1), 30 segundos y 1 minuto a 72°C. Tras los 30 ciclos de amplificación se mantuvo la muestra a 72°C durante 7 minutos para finalizar la extensión de las cadenas.

## 5.2. Reacciones de PCR-DGGE

Para llevar a cabo la electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE), las reacciones de PCR previas se realizaron utilizando las parejas de cebadores descritos en la Tabla 3, que presentan la peculiaridad de que uno de los oligonucleótidos porta una cola de GC en el extremo 5' (GC-clamp).

Se empleó la pareja de oligonucleótidos HDA1GC y HDA2 que amplifican la región V3 del ADNr 16S y la pareja de cebadores F968GC y R1401 que amplifican la región V6-V8 del ADNr 16S (Anexo 2). Se usó el kit comercial *iProof High-Fidelity Master Mix* (BioRad) que permite la amplificación de moldes con alto contenido GC o con estructuras secundarias



diferentes porcentajes (desde 0,8 hasta 2% dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar), y TAE 1x como tampón y disolvente de la agarosa.

Las muestras de ADN se prepararon añadiendo tampón de carga 6x. Una vez cargadas en el gel, se lleva a cabo la electroforesis en tampón TAE 1x aplicando un voltaje aproximado de 5 V por cm<sup>2</sup> de la cubeta. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio durante 15-20 minutos. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en la doble hélice de ADN, permitiendo que éste se haga visible cuando incide sobre él la luz ultravioleta.

El tamaño de las bandas de ADN en los geles de agarosa se estimó por comparación con varios marcadores de peso molecular. A continuación, se citan algunos de ellos y el tamaño de las bandas que los componen:

- $\lambda$ /HindIII: 23.130; 9.416; 6.557; 4.361; 2.322; 2.027; 564; 125 pb.
- $\lambda$ /PstI: 11.509; 5.080; 4.649; 4.505; 2.840; 2.577; 2.454; 2.443; 2.140; 1.980; 1.700; 805; 516; 467; 448; 339; 265; 247; 210 pb.

**TAE 50X:** 242 g de Tris-HCl; 100 mL de EDTA 0,5 M; pH 8,0; 57,1 mL de ácido acético y agua destilada hasta 1 litro.

**Tampón de carga 6X:** Sacarosa 40% (p/v); azul de bromofenol 0,25% (p/v) y xileno cianol 0,25% (p/v).

**Bromuro de etidio:** solución 10 mg/mL en agua. Se conserva a 4° C. Teñir entre 5-30 minutos.

## 6.2. Electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE)

### 6.2.1. Elaboración de los geles

La preparación de las soluciones desnaturizantes de acrilamida con diferentes concentraciones de urea y formamida se realizó a partir de la combinación de dos soluciones cuya composición se indica en la Tabla 4.

Reactivos	Solución al 0%	Solución al 100%
Acrilamida/Bisacrilamida (30%)	27 mL (8%) / 33 mL (10%)	27 mL (8%) / 33 mL (10%)
TAE 50x	2 mL	2 mL
Formamida deionizada	----	40 mL
Urea	----	42 g
Agua destilada	Hasta 100 mL	Hasta 100 mL

**Tabla 4.** Componentes empleados en la elaboración de las soluciones 0% y 100% desnaturizantes

Para soluciones desnaturalizantes menores del 100%, se emplean los mismos volúmenes de acrilamida, TAE 50x y agua destilada descritos anteriormente (Tabla 4), lo que varía es la cantidad de urea y formamida en función del porcentaje de la solución (Tabla 5).

Sol. Desnat.	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
Formamida (mL)	4	8	12	16	20	24	28	32	36
Urea (g)	4,2	8,4	12,6	16,8	21	25,2	29,4	33,6	37,8

**Tabla 5.** Volumen y cantidad de formamida y urea que es necesario añadir para soluciones desnaturalizantes menores del 100%.

Ambas soluciones una vez preparadas se desgasifican durante 10-15 minutos. Se filtran a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Y finalmente se guardan a 4°C (en una botella oscura hasta un mes).

Para realizar la polimerización de la acrilamida se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de persulfato amónico (Sigma-Aldrich) al 10% y 18  $\mu\text{L}$  de TEMED (N,N,N'N'-tetrametiletilendiamina) (Sigma-Aldrich). Se deja polimerizar aproximadamente durante una hora y media a temperatura ambiente.

Los gradientes formados dependieron de los tamaños de los productos amplificados a separar (Tabla 3). La correcta formación del gradiente en el gel, se comprobó añadiendo 100  $\mu\text{L}$  del reactivo *DCode dye solution* por cada 5 mL de solución de alta concentración de urea y formamida.

**Solución Dcode Dye:** Azul de bromofenol 0,5%; Xileno Cianol 0,5%, y TAE 1x 10 mL.

### 6.2.2. Electroforesis del ADN en geles en gradiente desnaturalizante

La electroforesis de los productos de PCR en geles en gradiente desnaturalizante se realizó en el aparato *DCode Universal Mutation Detection System* (BioRad) con una fuente de alimentación Power Pac 300 (BioRad). Como tampón de electroforesis se empleó TAE 1x a una temperatura constante de 60° C durante 15-16 h a 70 V. El volumen de las muestras cargadas en el gel fue variable dependiendo de su concentración, añadiéndose el mismo volumen de tampón de carga 2x *Gel Loading Dye* que de muestra de PCR.

Transcurrido ese tiempo el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/mL) durante 10-15 minutos y seguidamente se destiñó en TAE 1x durante 5-20 minutos dos veces

consecutivas. Una vez teñido el gel se visualizó bajo un transiluminador y se fotografió (Quantityone, GelDoc).

**2x Gel Loading Dye:** Azul de bromofenol 0,05%; Xileno cianol 0,05%; glicerol 70% y agua destilada hasta 10 mL.

### **6.2.3. Extracción de bandas para su secuenciación**

Las bandas de interés fueron cortadas del gel de poliacrilamida con un cubre estéril bajo luz ultravioleta e incubadas en 20  $\mu$ L de agua milliQ estéril a 4°C durante toda la noche. Alícuotas de 5  $\mu$ L fueron empleadas como molde en una reacción de PCR. Se llevó a cabo la reamplificación de la región ribosomal con el par de oligonucleótidos correspondiente pero sin portar la cola de poli-GC en el oligonucleótido correspondiente. Los fragmentos reamplificados fueron purificados y clonados con el sistema *StrataClone PCR Cloning* para posteriormente ser secuenciados.

## **7. TRANSFORMACIÓN Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *Escherichia coli*.**

### **7.1. Reacciones de ligación**

Una vez amplificados los fragmentos de las distintas especies presentes en la muestra, se procede a la ligación de los amplificados. Se empleó el Kit comercial *StrataClone PCR Cloning* (Stratagene). Se preparó la reacción de ligación mezclando en orden las siguientes cantidades: 3  $\mu$ L del tampón *StrataClone Cloning*, 2  $\mu$ L del producto de PCR (5-50 ng), 1  $\mu$ L del vector *StrataClone amp/kan*. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se colocó en hielo.

### **7.2 . Transformación de *E.coli***

Los productos de la reacción de ligación se transformaron en células químicamente competentes de *E.coli* (*StrataClone<sup>TM</sup> SoloPack<sup>®</sup> Competent cells*). Se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit comercial *StrataClone PCR Cloning* (Stratagene).

1. Se descongelan las células competentes lentamente en hielo durante unos 5 minutos. Una vez descongeladas, se mezcla el contenido de ese vial con 1  $\mu$ L de la reacción

- de ligación. La mezcla se incuba en hielo durante 20 minutos. Durante este periodo de incubación, se precalienta el medio LB a 42°C.
2. Se da un choque térmico a las células en un baño a 42°C sin agitación durante 45 segundos. A continuación se enfría rápidamente la mezcla en hielo durante 2 minutos.
  3. Se añaden 250 µL de medio LB precalentado a la mezcla de reacción de transformación. Y se incuba a 37°C con agitación (250 rpm) durante 60 minutos.
  4. Se siembra una alícuota de cada transformación en placas de petri con medio LB a las que se les ha añadido el antibiótico de selección adecuado y X-gal.
  5. Se incuban las placas a 37° C durante toda la noche.

**Kanamicina (kan):** el stock se preparó a una concentración de 50 mg/mL en agua y para la selección de bacterias portadoras del plásmido con resistencia a este antibiótico, se añadió a una concentración de 50 µg/mL.

**X-gal:** se preparó a una concentración de 25 mg/mL en dimetilformamida y en los experimentos de transformación de *E.coli* se utilizó a una concentración de 40 µg/mL.

### 7.3. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*: Minipreparaciones

Se siguió un método basado en el protocolo descrito por Holmes & Quigley (1981).

1. Se inocula una colonia aislada de *E.coli* en 1 mL de medio TB, suplementado con el antibiótico adecuado. Después se incuba a 37° C con agitación (250 rpm) durante al menos, 6 horas.
2. Se recogen las células por centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos. El precipitado se resuspende en 350 µL de STET y se añaden en la tapa del tubo eppendorf 10 µL de solución de lisozima (a una concentración de 10 mg/mL disuelta en agua).
3. Se mezclan durante un minuto con el vórtex para que se resuspenda bien el precipitado y seguidamente se hierve durante 45 segundos. Las proteínas y el ADN cromosómico se precipitan por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos.
4. Se elimina el precipitado obtenido (restos celulares y ADN cromosómico) con un palillo estéril y el sobrenadante se precipita con 1/10 de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y un volumen de isopropanol. Se mezclan y se mantienen a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5. Se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 minutos y se lava el precipitado resultante con etanol al 70%. Se seca el precipitado y se resuspende en 30  $\mu$ L de TE. Se usan 2  $\mu$ L del total para el análisis por digestión de endonucleasas de restricción.
- **STET:** Sacarosa 8% (p/v), Triton X-100 0,5% (v/v), Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 50 mM
  - **Tampón TE:** Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1mM, pH 8.

#### **7.4. Digestión del ADN con enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción fueron empleadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores (Roche y Fermentas). Cada una de ellas tiene unas condiciones óptimas de digestión en lo que se refiere a temperatura de incubación, concentración de sales y pH. Como norma general, el volumen de enzima añadido a la mezcla de digestión no debe de superar 1/10 de volumen total, esto es debido a la alta concentración de glicerol de las soluciones de almacenamiento que podrían inhibir la actividad enzimática, si el volumen añadido es elevado. Asimismo, es muy conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción.

El esquema general de una digestión con enzimas de restricción:

1. Se mezcla en un tubo eppendorf:
  - 1/10 del volumen total de digestión, de tampón 10x.
  - $n$   $\mu$ g de ADN disuelto en agua miliQ o en tampón TE (si el ADN está disuelto en tampón TE, se recomienda que el volumen utilizado en la mezcla no supere la décima parte del total de la reacción, para evitar modificar las características del tampón de digestión).
  - 2x unidades de enzima.
  - Agua destilada estéril hasta completar el volumen de digestión.
2. Se incuba a la temperatura recomendada durante 2-3 horas.

## 7.5. Purificación de ADN plasmídico para secuenciación

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare).

1. Se inocula una colonia de un transformante de *E. coli* en 1,5 mL de medio TB suplementado con el antibiótico adecuado, se incuba a 37° C con agitación (250 rpm) durante un mínimo de 6 h. (Para conseguir un rendimiento más alto se prepara un cultivo de 3 mL).
2. Se centrifuga a la máxima velocidad (~16.000 xg) durante 30 segundos. Se descarta el sobrenadante y se vuelve otra vez a centrifugar. Se elimina cuidadosamente todo el sobrenadante con una pipeta.
3. El pellet se resuspende en 200 µL de la solución I utilizando el vórtex.
4. Se añaden a continuación 200 µL de la solución II y se mezcla inmediatamente por inversión (aproximadamente unas 5 veces) hasta que la solución se convierta en clara y viscosa (La reacción de lisis no debe de exceder más de 5 minutos).
5. El siguiente paso es la neutralización. Se añaden 400 µL de la solución III y se mezcla inmediatamente por inversión (~ 10 veces) hasta que el precipitado esté totalmente homogeneizado para así asegurar un aislamiento del plásmido puro y de alto rendimiento.
6. Se centrifuga a la máxima velocidad (~16.000 xg) durante 4 minutos.
7. Se transfiere cuidadosamente el sobrenadante a una columna de purificación preparada y se coloca la columna en un tubo eppendorf (es importante evitar transferir restos celulares a la columna ya que puede afectar a la pureza del aislamiento del plásmido). Se centrifuga a la máxima velocidad durante 30 segundos. Se vacía el líquido del tubo eppendorf.
8. Lavado (opcional). Cuando se emplean cepas de *E. coli* que contienen el gen *EndA*<sup>+</sup> tipo silvestre es necesario realizar un lavado adicional con 400 µL de la solución III. Se centrifuga a la máxima velocidad durante 30 segundos y se desecha el fluido que pasa a través de la columna. Este paso es necesario para eliminar nucleasas potenciales y contaminación de carbohidratos.
9. Se añaden 400 µL de la solución de lavado etanólica y se centrifuga a la máxima velocidad durante 1 minuto. Cuidadosamente se descarta el fluido que pasa a través

de la columna. No debe quedar ningún resto de etanol, por tanto es recomendable volver a centrifugar durante 30 segundos.

10. Se transfiere la columna de purificación a un tubo eppendorf nuevo y se añaden 100  $\mu\text{L}$  del tampón de elución directamente en el centro de la columna. Se incuba durante 30 segundos y seguidamente se centrifuga a la máxima velocidad durante 30 segundos.

## **8. SECUENCIACIÓN DEL ADN**

La secuenciación de los insertos de los clones seleccionados se ha realizado utilizando los servicios de secuenciación automática del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (<http://www.unileon.es/investigación/ltiir/lti.htm>).

En las reacciones de secuenciación se usaron entre 300-500 ng de ADN plasmídico (en un volumen de 5-15  $\mu\text{L}$  de tampón de elución del kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin*), utilizando el kit *Thermo Sequenase Y Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing* (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las especificaciones indicadas por el fabricante, en un secuenciador automático (MEGABACE 500, Amersham Bioscience).

Las secuencias de ADN, una vez obtenidas, fueron editadas y revisadas con la ayuda de dos programas informáticos: por un lado el programa *BioEdit (Biological sequence alignment editor* para winXP, Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) que proporciona cromatogramas de las secuencias obtenidas del Servicio de Secuenciación de la Universidad de León y por otro lado el programa *EditSeq* (Lasergene, DNASTAR Inc.) mediante el cual las secuencias se editaron para eliminar los restos del vector y las zonas que presentaban muchos errores.

## **9. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS**

### **9.1. Análisis comparativo de las secuencias con las bases de datos**

Una vez revisadas las secuencias estudiadas se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), utilizando el método BLAST (*Basic Local*

*Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997). Concretamente el algoritmo BLASTN, que es específico para nucleótidos.

Actualmente son numerosas las entradas en la base de datos del GenBank cuyo origen es “bacteria no cultivada” y rara vez el programa BLASTN proporciona una entrada de bacterias cultivadas. Por ello, para la identificación de las secuencias también se ha recurrido al empleo del software *Ribosomal Database Project release 10* (RDP) (Cole *et al.*, 2007) disponible en internet (<http://rdp.cme.msu.edu>), y su herramienta *Classifier* (Wang *et al.* 2007) con un umbral de confianza del 80%.

## 9.2. Alineamiento de secuencias

Se ha realizado un alineamiento múltiple de todas las secuencias estudiadas y un alineamiento múltiple de las secuencias estudiadas junto con las secuencias de referencia obtenidas en la búsqueda con el BLASTN (tanto las cultivadas como las no cultivadas). Estos alineamientos permiten asegurar que las posiciones nucleotídicas comparadas son homólogas con todas las secuencias. El alineamiento se ha realizado utilizando el programa *ClustalW* que es proporcionado por el paquete informático MEGA versión 4 (<http://www.megasoftware.net>).

# 10. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN FILOGENÉTICA

## 10.1. Análisis filogenético

Para la clasificación de las secuencias estudiadas se ha realizado un análisis filogenético con el programa informática MEGA versión 4. Con la finalidad de obtener un mejor resultado, en este análisis se han incluido todas las secuencias de ADN obtenidas en el estudio, así como las secuencias con mayor similitud obtenidas en las comparaciones hechas con la base de datos empleando el algoritmo BLASTN.

Para la construcción de árboles filogenéticos se ha empleado el método *Minimum Evolution* (Kumar, 1996), modelo y método implementado por el programa MEGA versión 4. Según este modelo, el árbol óptimo es aquél que presenta los brazos más cortos. Como modelo de medición de distancia se eligió el modelo *Tamura-Nei* (Tamura & Nei, 1993), que da distinta probabilidad a la aparición de mutaciones por transiciones y transversiones y tiene en cuenta el porcentaje de AT o GC de cada linaje evolutivo. Esta distancia se calculó

por parejas de secuencias (*pairwise deletion*) con la eliminación de los gaps únicamente cuando está presente en una de las secuencias estudiadas.

## **10.2. Riqueza y diversidad**

Se ha evaluado la calidad del muestreo efectuado. Para ello se han realizado curvas de acumulación y de rarefacción para cada uno de los ambientes analizados. Las curvas de acumulación muestran el número de OTUs (*Operational Taxonomic Units*) acumulados conforme se va aumentando el esfuerzo de muestro en una comunidad, de manera que la riqueza aumentará hasta que llegue un momento en el cual aunque se incremente el esfuerzo de muestreo, el número de OTUs alcanzará un máximo y se estabilizará (Espinosa, 2003). Las curvas de rarefacción muestran el número de OTUs estadísticamente esperado según se incrementa el esfuerzo de muestreo; representan así la expectativa estadística para las correspondientes curvas de acumulación. En este trabajo, las curvas de rarefacción se han calculado para 1000 submuestras aleatorias (Figura 2).

También se ha determinado la riqueza observada de las comunidades de bacterias estudiadas. La riqueza se basa únicamente en el número de filotipos u OTUs presentes, sin tener en cuenta la abundancia de los mismos. La forma ideal de medir esta riqueza es contar con un inventario completo para conocer el número total de OTUs. En el caso de comunidades muy diversas, como las comunidades de bacterias, esta situación ideal es muy difícil de alcanzar, por lo que se recurre a índices de riqueza obtenidos a partir de un muestreo de la comunidad.

Los índices basados en la estructura de una comunidad de bacterias reflejan la distribución proporcional del valor de abundancia de cada especie. En este trabajo se ha utilizado el índice de dominancia de Simpson, que muestra la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean del mismo OTU (Brown & Bowman, 2001) y el índice de equidad de Shannon-Wiener, escogido al azar de una colección (Peet, 1974; Baev & Penev, 1995; Magurran, 1988; Moreno & Halffter, 2001) asumiendo que los individuos son seleccionados al azar y que todos los OTUs están representados en la muestra (Tabla 6).

Estos análisis de riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias estudiadas se han realizado mediante el software MOTHUR ([http://www.mothur.org/wiki/Main\\_Page](http://www.mothur.org/wiki/Main_Page)) desarrollado para estudios de Ecología Microbiana (Schloss *et al.*, 2009).

**Rarefacción**

$$E(S) = \sum 1 - \left( \frac{(N - N_i) \times n^{-1}}{N \times n^{-1}} \right)$$

E(S)=número esperado de OTUs; N=número total de OTUs en una muestra; N<sub>i</sub>=número de bacterias del iésimo OTU; n=tamaño de la muestra estandarizado.

**Índice de Simpson**

$$D = \sum (N_i \times \frac{N_i - 1}{n} \times (n - 1))$$

N=número total de OTUs en una muestra; N<sub>i</sub>=número de bacterias del iésimo OTU; n=tamaño de la muestra estandarizado.

**Índice de Shannon-Wiener**

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

p<sub>i</sub>=abundancia proporcional del OTU i, es decir, número de bacterias del OTU i entre el total de bacterias de la muestra.

**Tabla 6.** Índices y modelos estudiados para el estudio de la riqueza específica y la diversidad de las comunidades de bacterias en este trabajo

**10.3. Análisis comparativo (UniFrac)**

Las diferencias entre comunidades de bacterias estudiadas se han analizado mediante la herramienta UniFrac (Lozupone & Knight, 2005). Esta herramienta permite realizar diferentes análisis estadísticos en un contexto filogenético.

Se han identificado las diferencias significativas de composición y estructura entre las distintas comunidades de bacterias analizadas, empleando los estadísticos *Weighted UniFrac* y P test (Martin, 2002), con 100 réplicas o permutaciones, ambos proporcionados en el software UniFrac (<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>).

El estadístico UniFrac utiliza el algoritmo UniFrac, de forma que las comunidades son significativamente diferentes si el valor del algoritmo UniFrac para el árbol filogenético real es mayor que el valor que se esperaría si las secuencias se distribuyeran aleatoriamente entre las comunidades. Para ello, se realiza 100 veces una distribución aleatoria de las secuencias entre las diferentes comunidades y se calcula cada vez el valor del algoritmo. El algoritmo UniFrac mide la diferencia entre dos comunidades en relación a la longitud de las ramas que son únicas para una comunidad o para otra. En este estudio se ha empleado una variante de este algoritmo, *Weighted UniFrac*, que pondera unas ramas y otras ramas en función de

datos de abundancia, de forma que no considera únicamente la riqueza sino también la abundancia relativa de las bacterias.

El P test también utiliza la información filogenética de las comunidades estudiadas para identificar si estas comunidades son significativamente diferentes. En este caso el P test estima la similaridad entre las comunidades como el número de cambios parsimónicos que se requerirían para explicar la distribución de las secuencias entre las diferentes comunidades en el árbol filogenético.

Otra aplicación implementada en el software UniFrac empleada en este trabajo ha sido *Cluster Environments*, la cual desarrolla un análisis cluster jerárquico (UPGMA) de las comunidades a partir de una matriz de distancias generada calculando los valores por parejas del algoritmo Weighted UniFrac. La robustez de este análisis clúster jerárquico se ha evaluado mediante el método estadístico de remuestreo Jackknife, con 100 réplicas.

Finalmente, se ha realizado un Análisis de Componentes Principales (ACP) que es una técnica estadística multivariante de síntesis de la información o reducción de la dimensión (número de variables), que permite encontrar los factores subyacentes más explicativos tras un conjunto de datos, que mejor expliquen la variabilidad de estos datos. La elección de los factores se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. Del total de factores se elegirán aquellos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente. A estos se les denominara componentes principales. Este análisis se ha realizado mediante el software UniFrac, que en este caso toma como dato de partida la matriz de distancias por parejas generadas con el algoritmo Weighted UniFrac.

## **11. ANÁLISIS DE LOS DATOS**

Con el objeto de determinar si existen diferencias significativas a nivel de filo y de género, entre las comunidades de bacterias de la parte alta del intestino delgado de individuos adultos (sanos, enfermos celíacos activos y enfermos celíacos tratados) y de niños (sanos y enfermos celíacos activos), se ha realizado la prueba de Kruskal-Wallis, que constituye una alternativa no paramétrica al uso del análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con los datos reemplazados por categorías. Esta prueba es una extensión para tres o más grupos de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (equivalente no paramétrico

de la prueba t para la diferencia de dos medias cuando las muestras son independientes). La prueba U de Mann-Whitney se ha utilizado también para determinar si existen diferencias a nivel de filo y género asociadas a la dieta o a la enfermedad.

El estudio de la riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias, realizado en un contexto filogenético de acuerdo a lo desarrollado en el apartado 10.2. Riqueza y diversidad, se ha completado realizando un tratamiento estadístico de los resultados obtenidos. Para determinar si existen diferencias significativas en cuanto a riqueza entre las comunidades de bacterias se llevo a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con un test *post-hoc* (Scheffé test). También se han empleado las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para determinar si existían diferencias significativas en cuanto a índices de diversidad.

Los diferentes perfiles electroforéticos de bandas obtenidos para cada uno de los pacientes analizados mediante DGGE, fueron transformados en una matriz binaria en función de su presencia (1) o ausencia (0). Las bandas producidas por los diferentes pacientes fueron consideradas como idénticas cuando mostraron igual migración en el gel. Se realizó un análisis de agrupamiento por similitud genética estimada según el coeficiente de Dice (Van Der Gucht *et al.*, 2001) y el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) que utiliza la media aritmética no ponderada como método de agrupamiento. Esta matriz de similitud puede ser mostrada gráficamente como un dendograma. Se utilizó para ello el programa Tulkas (programa informático diseñado por el Dr. Luis E. Sáenz de Miera, profesor de genética de la Universidad de León).

Coeficiente de Dice

$$Sd = \frac{2j}{2j + a + b}$$

**j:** número de bandas comunes a ambas muestras

**a:** es el número de bandas de la muestra A

**b:** es el número de bandas de la muestra B

El número de bandas de cada individuo en cada perfil electroforético obtenidos a partir del DGGE fue considerado como un indicador de la diversidad de la microbiota fecal. Para determinar las diferencias entre los pacientes sanos y enfermos se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney También se determinaron las diferencias en la

composición de especies entre los diferentes grupos de poblaciones, para ello se empleo el test “chi-cuadrado”.

Todos los análisis estadísticos se han realizado con el paquete estadístico SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS Inc., 2006). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para valores de p menores de 0,05.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



# 1. ESTUDIO MOLECULAR DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LA PARTE ALTA DEL INTESTINO DELGADO EN NIÑOS Y ADULTOS

La microbiota comensal de las superficies epiteliales tiene una función importante en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune del intestino. Un desequilibrio del balance entre tolerancia e inmunidad probablemente contribuya a la patogénesis de la mayoría de los procesos inflamatorios, incluyendo también las intolerancias alimentarias (Ou *et al.*, 2009). Por este motivo, el objetivo de este apartado fue la caracterización de la microbiota de la parte alta del intestino delgado en individuos adultos (sanos, enfermos celíacos activos y enfermos celíacos tratados) y a su vez compararla con la microbiota del intestino delgado de dos grupos de niños (sanos y enfermos celíacos activos). Para ello, se llevó a cabo la construcción de colecciones de clones de una región del ADN<sub>r</sub> 16S a partir del ADN extraído de biopsias duodenales de cada uno de los pacientes.

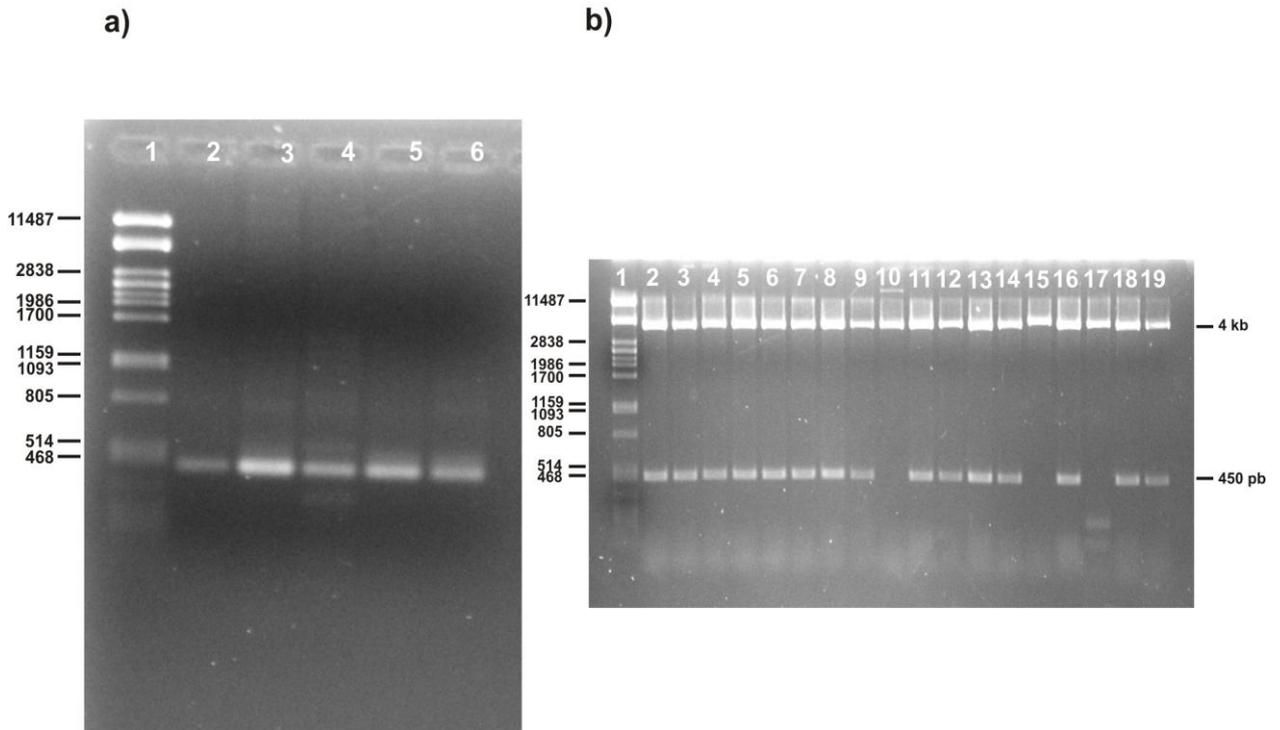
## 1.1. Construcción de colecciones de clones del ADN<sub>r</sub> 16S

Para el análisis de las comunidades bacterianas presentes en biopsias duodenales de adultos y niños se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de 15 muestras de biopsias duodenales procedentes de individuos adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) y 8 muestras duodenales obtenidas a partir de niños no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>) y enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>) (Anexo 1). Se siguió el protocolo del kit *NucleoSpin Tissue XS* (descrito en Materiales y Métodos).

Seguidamente, se llevó a cabo una reacción de PCR empleando como molde el ADN extraído a partir de las biopsias duodenales de cada uno de los pacientes. Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos F968 y R1401 que amplifican la región V6-V8 del ADN<sub>r</sub> 16S (Figura 1a) (Anexo 2). Cada reacción de PCR se repitió cuatro veces de forma independiente. La mezcla de los productos de PCR fueron subclonados en el vector pSC-A-amp/kan siguiendo el protocolo del kit *StrataClone PCR Cloning* de Stratagene (descrito en Materiales y Métodos).

Por cada paciente se seleccionaron sobre 50 transformantes al azar. Esta selección se llevó a cabo en función de la presencia de un inserto del tamaño esperado (450 pb). Para ello

se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* que corta ambos lados del producto de PCR que se ha subclonado en el plásmido y se analizó en un gel de agarosa (Figura 1b). El ADN de estos clones seleccionados fue purificado empleando el kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin* (descrito en Materiales y Métodos) y el ADN obtenido se envió al servicio de secuenciación de la Universidad de León.



**Figura 1. a)** Análisis de los productos de PCR correspondientes a la amplificación de la región V6-V8 del ADN<sub>r</sub> 16S en un gel de agarosa del 1,5%. Carril 1: marcador de peso molecular ADN del fago  $\lambda$  digerido con *PstI*; Carriles 2, 3, 4, 5 y 6: PCR utilizando como molde el ADN genómico de varios pacientes. **b)** ADN plasmídico digerido con *EcoRI* de 18 clones seleccionados al azar de uno de los pacientes analizados. Como marcador de peso molecular se empleó el ADN del fago  $\lambda$  digerido con *PstI* (carril 1). Los carriles del 2 al 19 corresponden con los 18 clones. Nótese que todos los clones presentan una banda de aproximadamente 4 kb que corresponde con el tamaño del plásmido pSC-A-amp/kan y otra banda adicional correspondiente al inserto de aproximadamente 450 pb. Los carriles 10, 15 y 17 no presentaron dicho inserto.

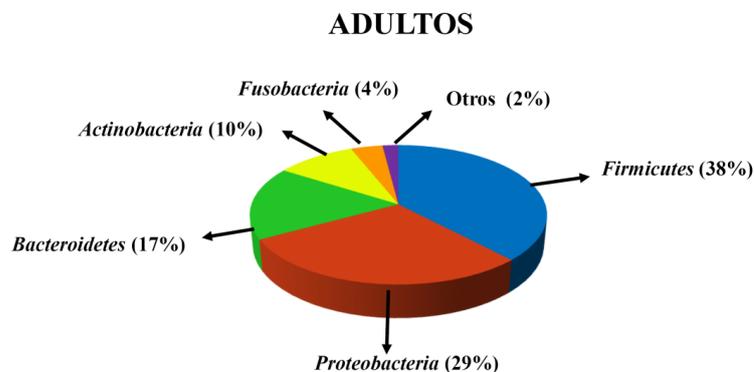
Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron editadas y revisadas. Con ellas se llevó a cabo una búsqueda de secuencias similares empleando el algoritmo del BLAST específico para nucleótidos (BLASTN). También, se empleó el software *Ribosomal Database Project release 10* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu>) para llevar a cabo la identificación de las secuencias, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con el algoritmo BLASTN.

Para completar la identificación molecular de cada una de las secuencias se llevó a cabo un análisis filogenético. Las mismas secuencias que fueron procesadas para la búsqueda con el algoritmo del BLASTN se alinearon entre sí y con las secuencias obtenidas de las bases

de datos. Para el alineamiento se utilizó el programa *ClustalW* que es proporcionado por el paquete informático MEGA versión 4. A partir de este alineamiento se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético para cada uno de los pacientes (Anexos del 3 al 30), permitiendo así la identificación de las secuencias a nivel de género. Algunas secuencias, en las que no se encontraron secuencias similares en la búsqueda con el algoritmo BLASTN, no se pudieron clasificar en ningún género después de realizar el análisis filogenético y la búsqueda con el RDP. Estas secuencias se consideraron secuencias de bacterias de género desconocido que se denominaron como OTUs (*Operational Taxonomic Units*) con un número asociado.

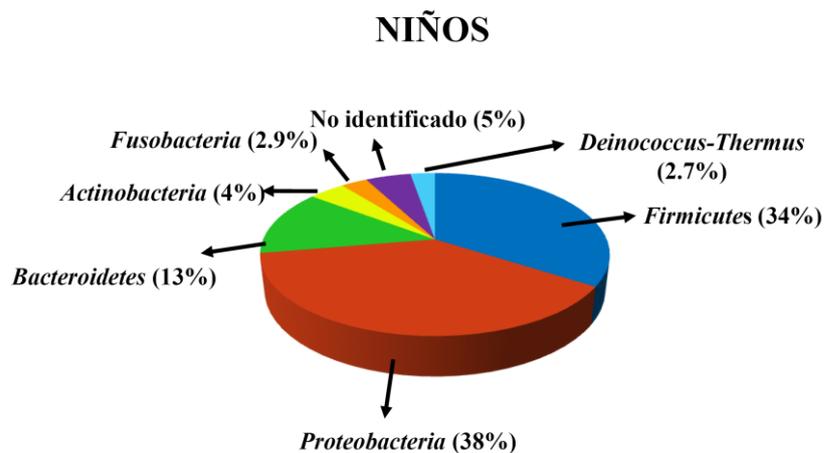
## 1.2. Composición de las comunidades de bacterias a nivel de filo

En los adultos, el 98% de las 753 secuencias bacterianas obtenidas a partir de la secuenciación de una región del ADNr 16S de biopsias duodenales, fueron clasificadas dentro de 5 filos. *Firmicutes*, *Proteobacteria*, y *Bacteroidetes*, fueron los filos que aparecían en mayor porcentaje de secuencias, y en menor proporción aparecían los filos *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. En la Figura 2, los datos aparecen reflejados como el porcentaje de bacterias del intestino delgado proximal pertenecientes a los diferentes filos. El análisis estadístico mostró que había diferencias significativas asociadas a la dieta en los filos *Fusobacteria* y *Proteobacteria* ( $p=0,002$  y  $p=0,003$  respectivamente; prueba U de Mann-Whitney). En cambio, en el resto de los filos las diferencias no fueron significativas. A nivel de filo no se encontraron tampoco diferencias significativas asociadas a la enfermedad.



**Figura 2.** Diagrama sectorial mostrando la distribución de los filos bacterianos en el intestino delgado proximal de individuos adultos. Las flechas indican el porcentaje de secuencias pertenecientes a cada uno de los filos.

En los niños (incluyendo sanos y enfermos celíacos activos), se obtuvieron resultados similares a los de los adultos, a partir de la secuenciación y análisis de 667 secuencias bacterianas. *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, al igual que en los adultos aparecen como los filos más frecuentes (Figura 3). Y en menor proporción, aparecen los filos *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus* y *Fusobacteria*. Un 5% de las secuencias bacterianas no se pudo clasificar dentro de ningún filo bacteriano conocido y sólo se observó la presencia de este filo sin identificar en niños sanos.

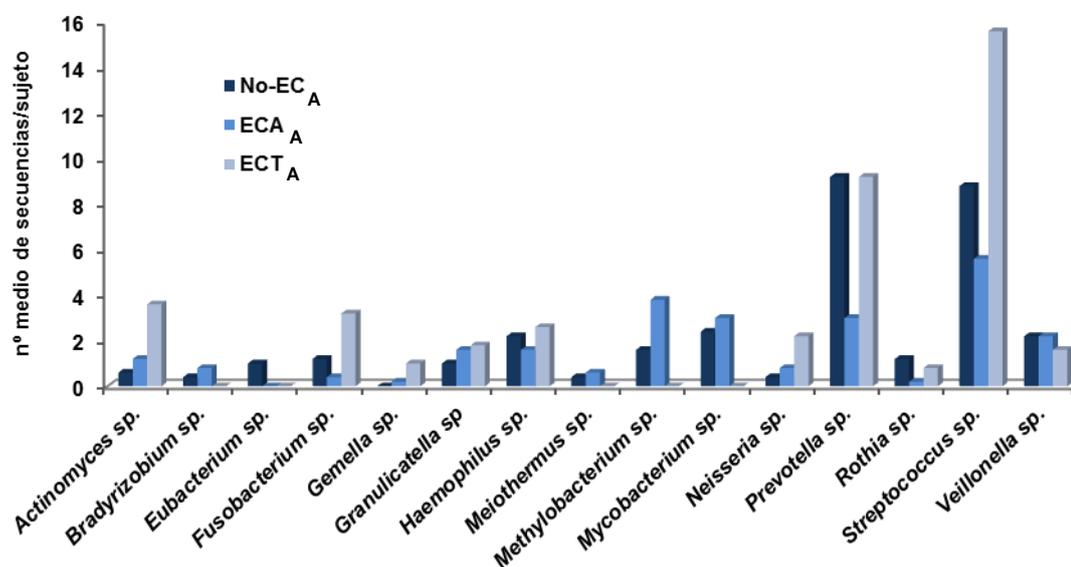


**Figura 3.** Diagrama sectorial mostrando la distribución de los filos bacterianos en el intestino delgado proximal de niños. Las flechas indican el porcentaje correspondientes de cada uno de los filos.

No se encontraron diferencias significativas en los filos identificados comparando niños sanos y niños enfermos celíacos activos. Si que se encontraron diferencias significativas al comparar las comunidades de bacterias de adultos y de niños con relación a dos filos. Por un lado, se encontraron diferencias significativas en el filo *Actinobacteria*, al comparar las comunidades de bacterias de adultos sanos y niños sanos, que podrían estar asociadas a la edad ( $p=0,032$ ; U de Mann-Whitney). Y por otro lado, diferencias significativas en el filo *Proteobacteria* entre las comunidades de bacterias de toda la muestra de individuos sanos y enfermos celíacos, independientemente de la edad y la dieta ( $p=0,018$ ; U de Mann-Whitney). Estas diferencias podrían estar asociadas al diagnóstico.

### 1.3. Composición de las comunidades bacterianas en individuos adultos

El análisis filogenético de las secuencias determinó la presencia de 61 géneros de bacterias conocidas en la parte alta del intestino delgado de individuos adultos. Del total, 15 géneros aparecían en más del 60% de la población. Estos géneros aparecen representados en la Figura 4. El otro 40% de las secuencias bacterianas aparecieron con menor frecuencia y la gran mayoría de ellas sólo aparecían en una o dos de las biopsias analizadas. Los géneros *Streptococcus* y *Prevotella* fueron los más representativos, aparecieron en la mayoría de las biopsias analizadas y dominaron además cuantitativamente en número de secuencias.



**Figura 4.** Número medio de secuencias de los géneros bacterianos conocidos encontrados en la parte alta del intestino delgado de individuos adultos sanos (No-ECA), enfermos celíacos activos adultos (ECA) y enfermos celíacos tratados adultos (ECT). Los 15 géneros representados aparecen en más del 60% de la población estudiada.

Las diferencias más importantes que se observan entre individuos No-ECA, ECA y ECT fueron en el número de secuencias correspondientes a los géneros *Prevotella* y *Streptococcus* spp, donde se observó que el número medio de secuencias por individuo era mayor en ECT y No-ECA que en pacientes ECA (Figura 4). El test U de Mann-Whitney mostró que el número de secuencias correspondientes a *Streptococcus* spp fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre pacientes sanos y enfermos celíacos de acuerdo al diagnóstico. También se observaron cambios en el número de secuencias de los géneros

*Mycobacterium*, y *Methylobacterium*, que se detectaron únicamente en individuos No-EC<sub>AS</sub> y EC<sub>AS</sub>, y sin embargo, no aparecieron cuando se llevó a cabo la dieta libre de gluten. Estas diferencias también fueron significativas en función de la dieta (U de Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ). Al contrario de lo que se observó con los géneros *Fusobacterium* y *Actinomyces*, en los que el número medio de secuencias por individuo se ve incrementado en pacientes EC<sub>A</sub>. Pero estas diferencias no fueron significativas (U de Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ).

Filo	Clase	Orden	Familia	OTU
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria Gp3</i>			OTU 24
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		OTU 26
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	OTU 18
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	OTU 3, OTU 32, OTU 38
			<i>Ruminococcaceae</i>	OTU 19
			<i>Clostridiaceae</i>	OTU 25
			<i>Incertate Sedis XI</i>	OTU 30, OTU 37
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriales</i>	<i>Leptotrichiaceae</i>	OTU 31
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitropiraceae</i>	OTU 27
<i>Proteobacteria</i>				OTU 16
	<i>Alfaproteobacteria</i>			OTU 1
		<i>Rhizobiales</i>		OTU 4
	<i>Betaproteobacteria</i>			OTU 2
		<i>Methylophilales</i>	<i>Methylophilaceae</i>	OTU 5
		<i>Burkholderiales</i>		OTU 7
			<i>Burkholderiales incertae-sedis</i>	OTU 8
			<i>Comamonadaceae</i>	OTU 15
			<i>Oxalobacteraceae</i>	OTU 28
	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	OTU 9
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Legionellales</i>	<i>Coxiellaceae</i>	OTU 13
				OTU 17, OTU 22
TM7				OTU 6
Filo desconocido				OTU 10
				OTU 21

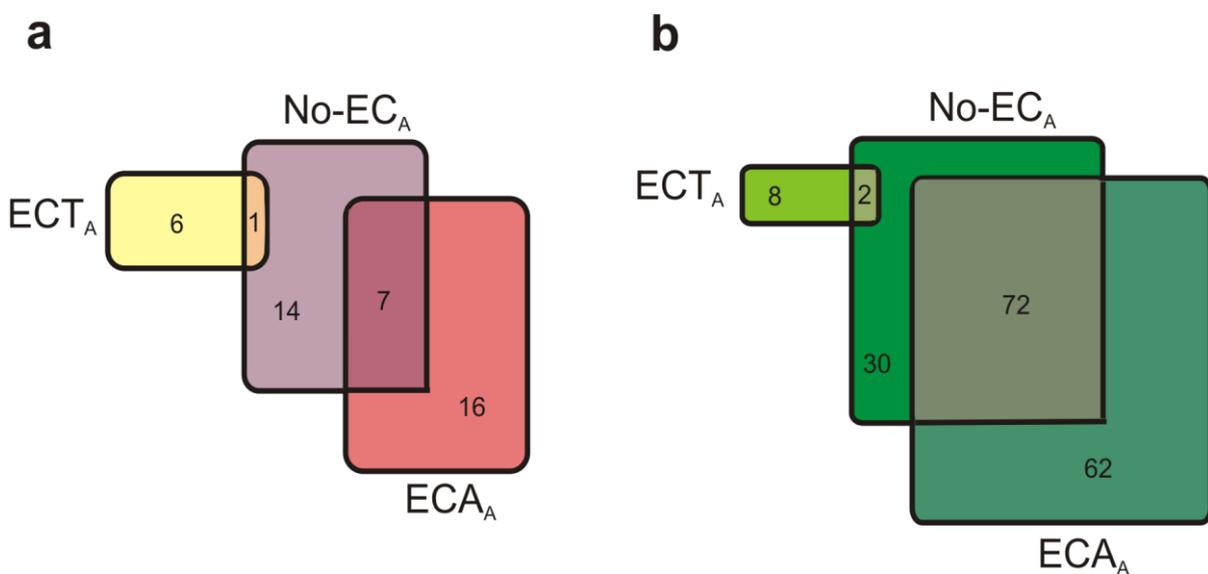
**Tabla 1.** Posición filogenética de cada uno de los OTUs encontrados en biopsias de adultos.

El análisis de las 753 secuencias de la población adulta, mostró también la presencia de 28 secuencias diferentes clasificadas como bacterias desconocidas que nunca habían sido cultivadas. Estas secuencias fueron denominadas OTUs (*Operational Taxonomic Units*) y no

se les pudo asignar a ningún género conocido. La posición filogenética de cada uno de esos OTUs obtenida a partir del análisis con el RDP, aparece representada en la Tabla 1.

En los individuos No-EC<sub>AS</sub> se encontraron 14 OTUs diferentes, 16 en ECA<sub>AS</sub> y 6 en ECT<sub>AS</sub> (Figura 5a). Los pacientes No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub> compartieron 7 OTUs representados por más de 70 secuencias (Figura 5b), indicando por tanto, la existencia de una población consistente de bacterias no conocidas entre individuos sanos y enfermos celíacos activos. Al contrario de lo que se observó entre pacientes No-EC<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub> que sólo compartían un OTU, que aparecía únicamente en dos secuencias.

No se encontró ningún OTU cuando se comparó la población de secuencias de ECA<sub>AS</sub> con la de ECT<sub>AS</sub>. Tampoco se encontró ningún OTU en común entre las tres poblaciones de individuos adultos (No-EC<sub>AS</sub>, ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>) (Figura 5a). Estos resultados sugieren que el tratamiento de los pacientes enfermos celíacos con la DSG conduce a un cambio importante en la población de bacterias no cultivadas.

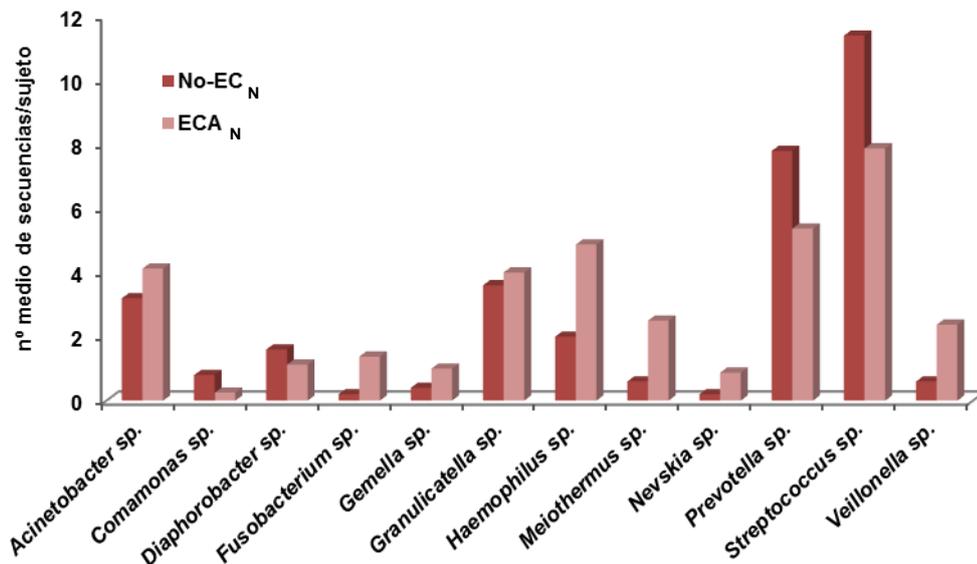


**Figura 5.** Diagrama de Venn comparando las OTUs en poblaciones de individuos adultos sanos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>). (a) Distribución del número de OTUs diferentes (b) Representación del número de secuencias de OTUs.

### 1.4. Composición de las comunidades de bacterias en niños

El análisis filogenético de la composición de las comunidades de bacterias en la población de niños determinó la presencia de 36 géneros diferentes de bacterias conocidas, lo cual reflejó que los niños presentaban una riqueza menor en comparación con los adultos. La mayoría de las secuencias (Figura 6) pertenecieron a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Granulicatella* y *Acinetobacter*. En el resto de géneros el número medio de secuencias por sujeto se mostró menor (valor medio  $\leq 2$  secuencias/sujeto). Todas estas secuencias aparecían en más del 60% de la población de niños analizados.

Los géneros *Streptococcus* y *Prevotella*, mostraron un patrón similar al observado en los adultos: mayor proporción en individuos no enfermos celiacos (No-EC<sub>N</sub>) que en niños celiacos activos (ECA<sub>N</sub>). Al contrario, de lo que se observó en las secuencias pertenecientes a los géneros *Neisseria* y *Haemophilus*, donde el incremento en el número medio de secuencias tuvo lugar en los niños enfermos (Figura 6). En ninguno de los casos las diferencias fueron significativas (U de Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ).

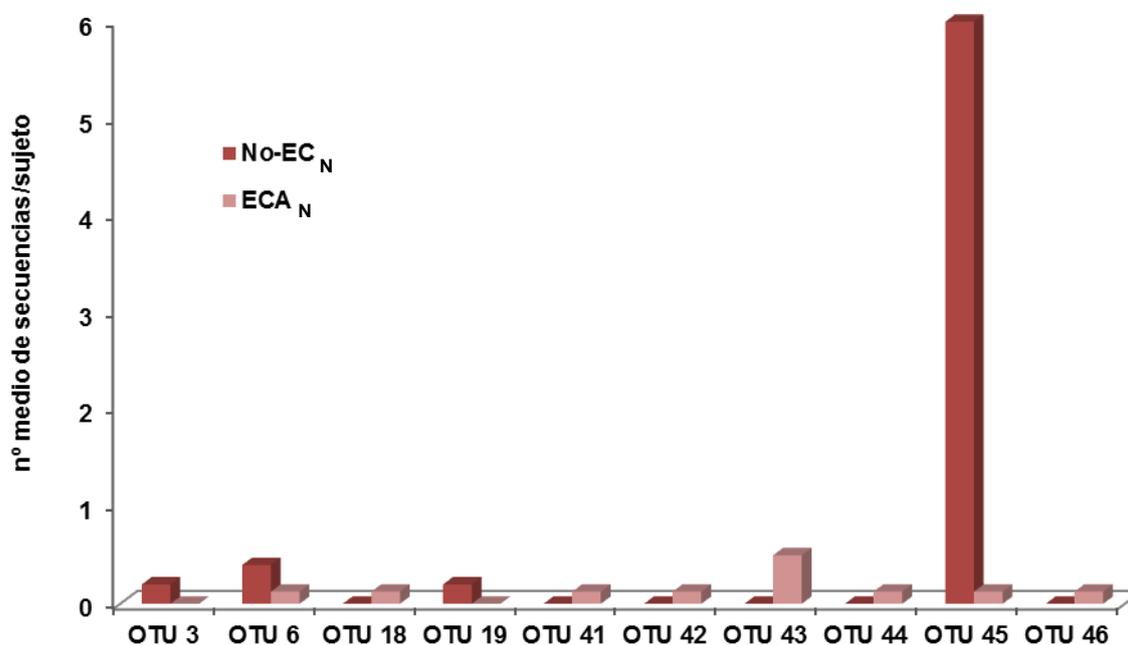


**Figura 6.** Número medio de secuencias de los géneros bacterianos conocidos encontrados en la parte alta del intestino delgado de niños sanos (No-EC<sub>N</sub>) y niños enfermos celiacos en estado activo (ECA<sub>N</sub>). Los 12 géneros representados en la gráfica aparecen en más del 60% de la población de sujetos estudiados.

Filo	Clase	Orden	Familia	OTUs
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	OTU 18, OTU 43
<i>Firmicutes</i>				OTU 3
	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>		OTU 42, OTU 44
			<i>Lachnospiraceae</i>	OTU 19
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>			OTU 46
		<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	OTU 41
TM7				OTU 6
Filo no identificado				OTU 45

**Tabla 2:** Posición filogenética de cada uno de los OTUs encontradas en biopsias de niños.

En el grupo de los niños, el análisis de las 667 secuencias mostró también la presencia de 10 secuencias diferentes clasificadas como bacterias no conocidas, que fueron también designadas como OTUs. Los OTUs 3, 6, 18 y 19 fueron compartidos con la población de secuencias de OTUs de individuos adultos. Por el contrario, los OTUs 41, 42, 43, 44, 45 y 46 sólo se encontraron en la población de secuencias de OTUs de los niños (Figura 7). La posición filogenética de cada uno de esos OTUs aparece representada en la Tabla 2.



**Figura 7.** Número medio de secuencias de OTUs por sujeto encontrados en la parte alta del intestino delgado de niños sanos (No-EC<sub>N</sub>) y niños enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>).

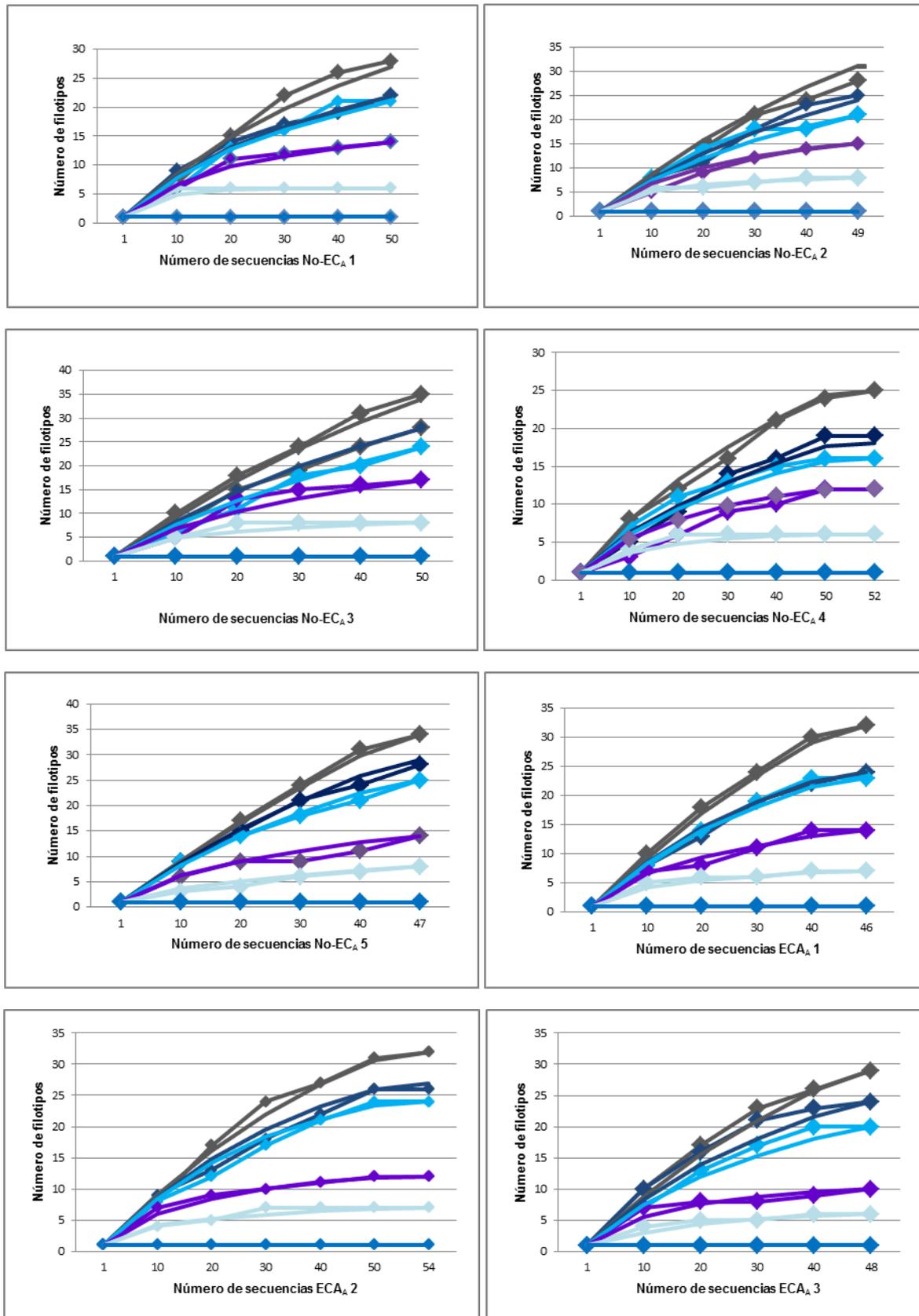
Los individuos No-EC<sub>N</sub> mostraron la presencia de cuatro secuencias diferentes de bacterias no conocidas. La mayoría de estos OTUs fueron detectados en rangos menores de una secuencia por niño sano. Sin embargo, el OTU 45 estaba presente en el 60% de los individuos sanos en una media de 6 secuencias por niño; este fue el OTU más abundante detectado en la población de secuencias de niños. En cambio, en los niños celiacos se detectaron 8 OTUs diferentes, pero la mayoría de ellos, aparecían como una única secuencia o en un solo niño. El OTU 45 se detectó únicamente en una secuencia de un niño con enfermedad celiaca (Figura 7).

## **1.5. Riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas**

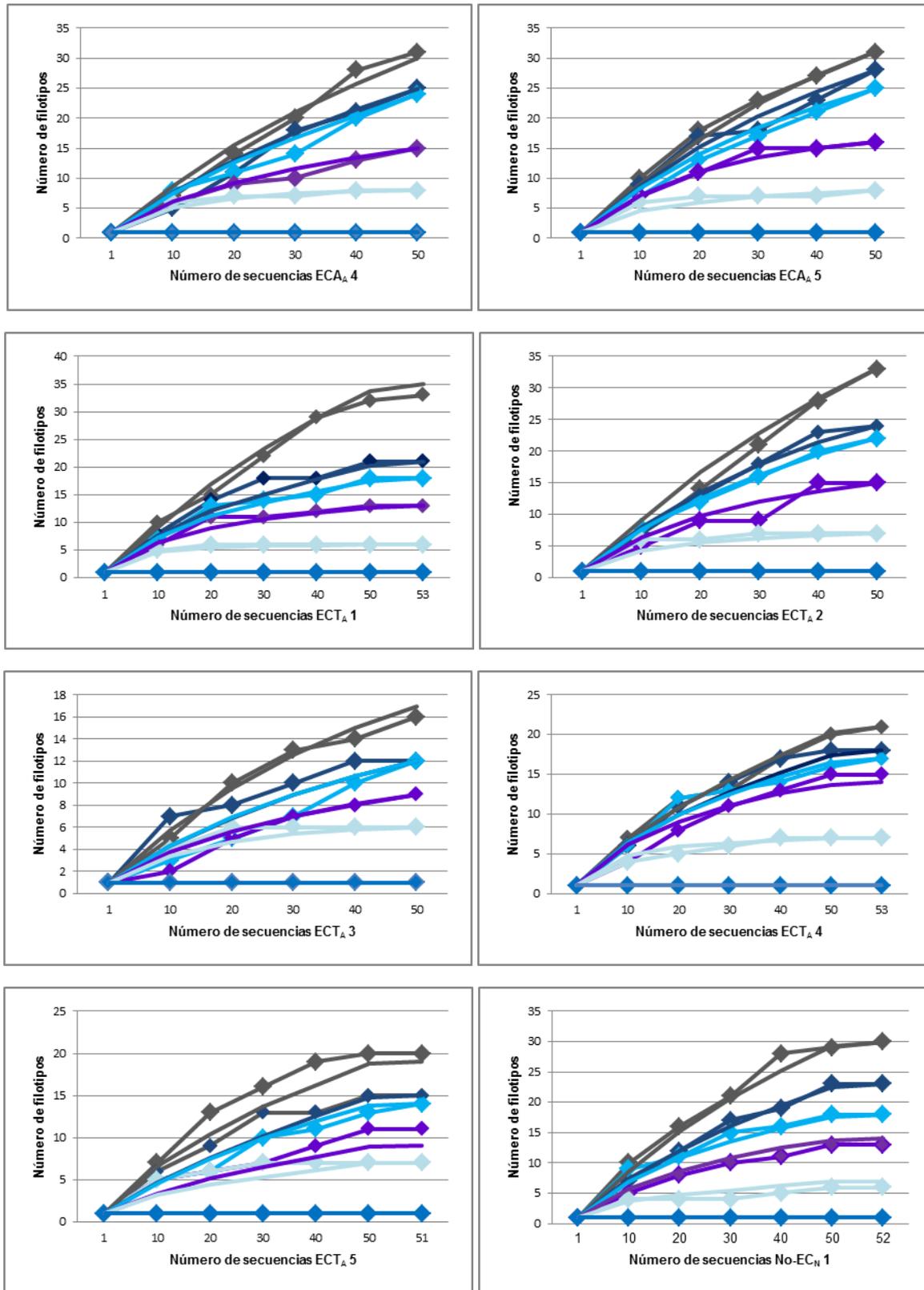
### **1.5.1. Las curvas de acumulación y rarefacción son adecuadas para evaluar la riqueza de las comunidades bacterianas a nivel de género**

Para evaluar la calidad del muestreo del estudio, se realizaron curvas de acumulación y curvas de rarefacción, que permiten conocer si el esfuerzo de muestreo (50 clones de cada comunidad) fue suficiente para estimar de forma precisa la riqueza y diversidad de una comunidad o si el número de clones resultó limitado.

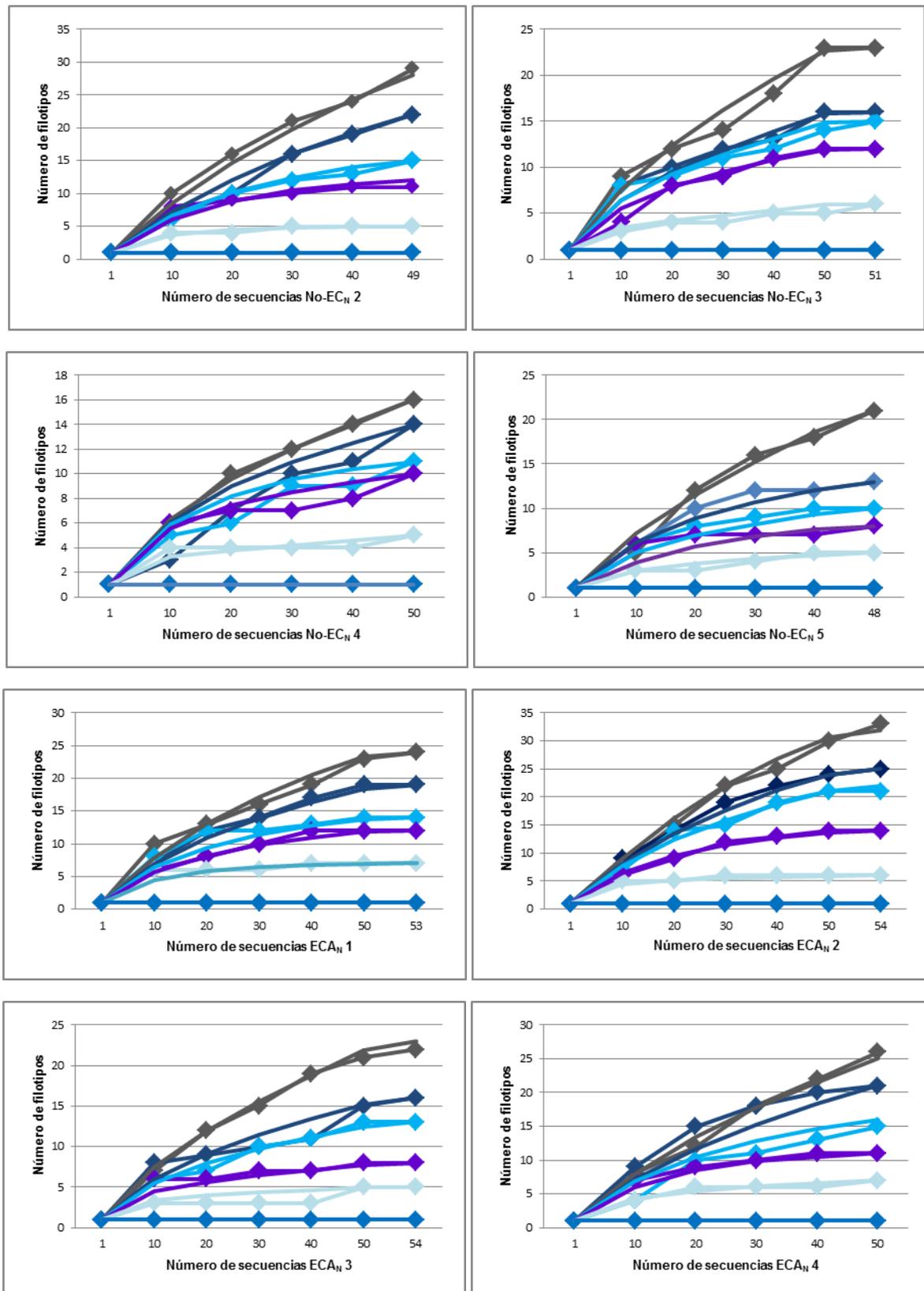
Las curvas de acumulación muestran el número de secuencias observadas (definidos) en función del esfuerzo de muestreo realizado, mientras que las de rarefacción reflejan el número de secuencias estadísticamente esperado en función del esfuerzo de muestreo realizado (Figura 8). Los resultados indican que con distancias filogenéticas pequeñas (0,01 y 0,05) según aumenta el esfuerzo de muestreo se incrementa el número de filotipos (tanto observados como esperados) sin que las curvas alcancen una asíntota horizontal, es decir, existe un sesgo en el muestreo. Sin embargo, cuando se han considerado distancias filogenéticas mayores para definir el número de filotipos (0,1; 0,2; 0,3 y 0,43), las curvas tienden a alcanzar una asíntota horizontal, lo que indica que aunque se incrementara el número de secuencias estudiadas, no se aumentaría el número de filotipos. Por tanto, considerando estas distancias filogenéticas la comunidad de bacterias estaría correctamente muestreada.



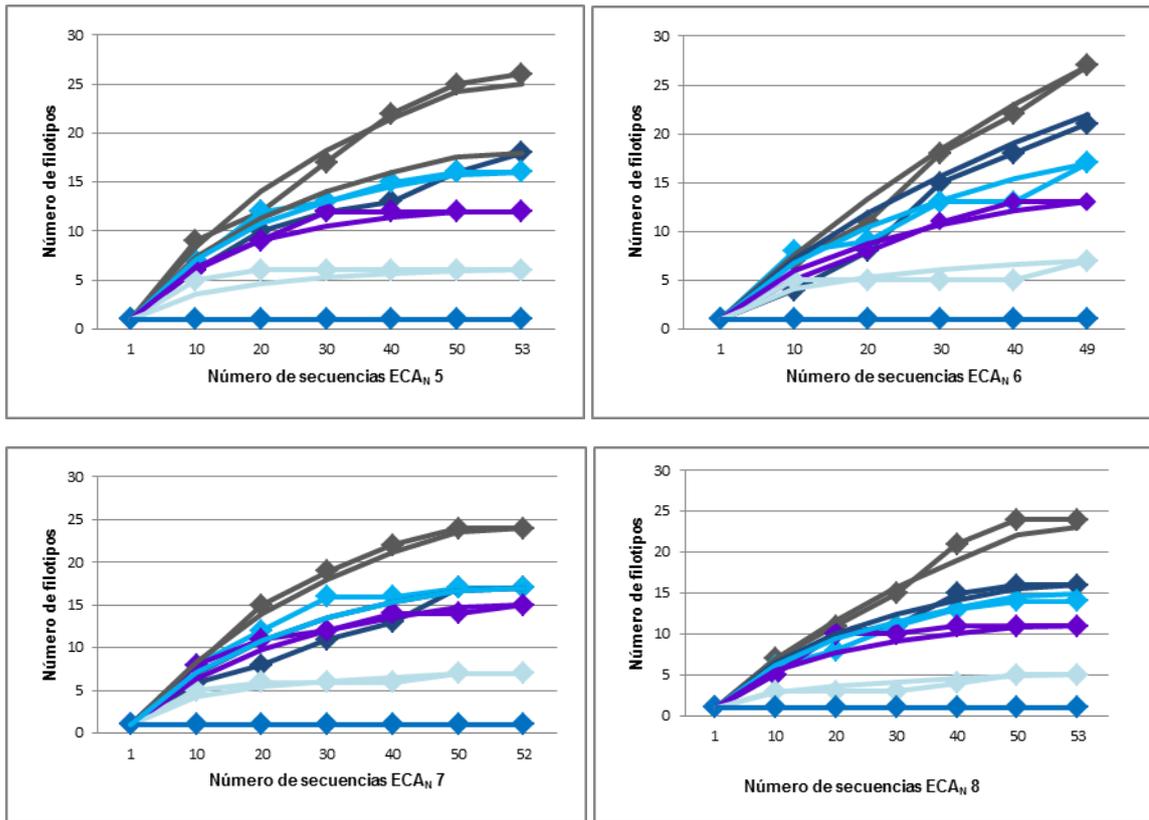
**Figura 8.** Curvas de acumulación (línea con marcadores  $\blacklozenge$ ) y curvas de rarefacción (línea sin marcadores  $\text{—}$ ). Considerando seis distancias filogenéticas (0,01  $\blacksquare$ ; 0,05  $\blacksquare$ ; 0,1  $\square$ ; 0,2  $\blacksquare$ ; 0,3  $\square$ ; 0,43  $\blacksquare$ ). Continúa en la página siguiente.



**Figura 8.** Curvas de acumulación (línea con marcadores  $\blacklozenge$ ) y curvas de rarefacción (línea sin marcadores  $\text{—}$ ). Considerando seis distancias filogenéticas (0,01  $\blacksquare$ ; 0,05  $\blacksquare$ ; 0,1  $\square$ ; 0,2  $\blacksquare$ ; 0,3  $\square$ ; 0,43  $\blacksquare$ ). Continúa en la página siguiente.



**Figura 8.** Curvas de acumulación (línea con marcadores  $\blacklozenge$ ) y curvas de rarefacción (línea sin marcadores  $\text{—}$ ). Considerando seis distancias filogenéticas (0,01  $\blacksquare$ ; 0,05  $\blacksquare$ ; 0,1  $\square$ ; 0,2  $\blacksquare$ ; 0,3  $\square$ ; 0,43  $\blacksquare$ ). Continúa en la página siguiente.



**Figura 8.** Curvas de acumulación (línea con marcadores  $\blacklozenge$ ) y curvas de rarefacción (línea sin marcadores  $\text{—}$ ) que muestra como aumenta el número de especies observado o esperado según se incrementa el esfuerzo de muestreo. Cada gráfica muestra estas curvas para cada comunidad bacteriana estudiada de individuos adultos ( $\text{No-EC}_A$ ,  $\text{ECA}_A$  y  $\text{ECT}_A$ ) y niños ( $\text{No-EC}_N$  y  $\text{ECA}_N$ ). Considerando seis distancias filogenéticas (0,01  $\blacksquare$ ; 0,05  $\blacksquare$ ; 0,1  $\blacksquare$ ; 0,2  $\blacksquare$ ; 0,3  $\blacksquare$ ; 0,43  $\blacksquare$ ).

El análisis de las curvas de rarefacción mostró que en la mayoría de los casos, para distancias filogenéticas mayores o iguales a 0,1; el esfuerzo de muestreo fue adecuado para evaluar la riqueza de las comunidades bacterianas a nivel de género.

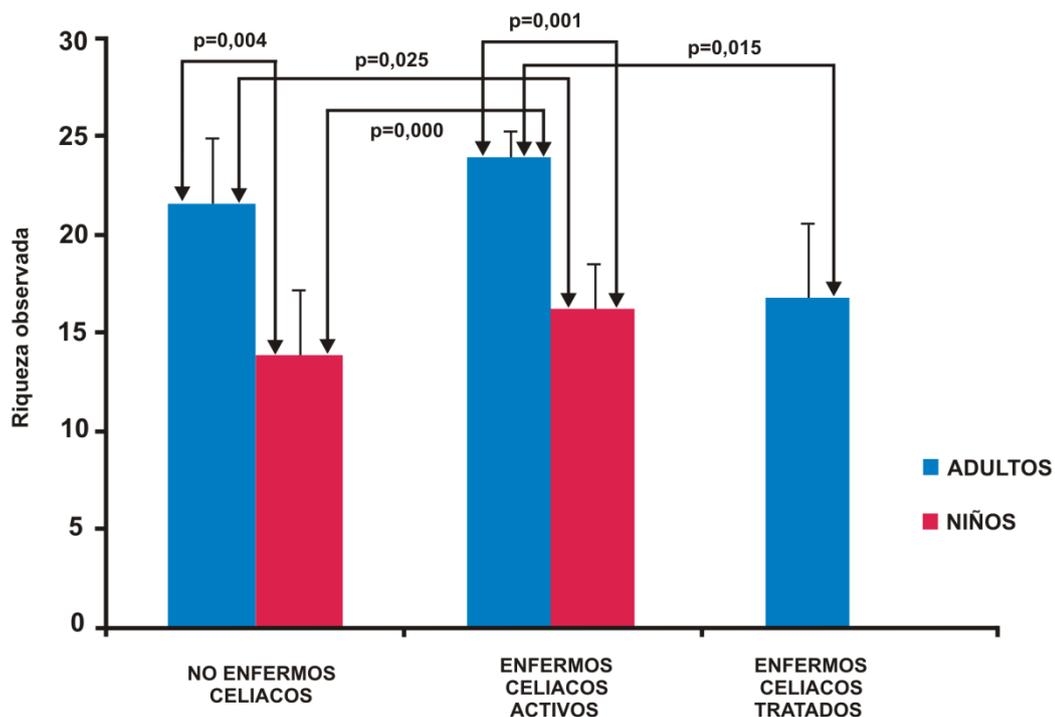
### 1.5.2. La riqueza observada es diferente en función de la edad y de la dieta

Se estudió la riqueza bacteriana observada en tres grupos de individuos adultos: sanos, enfermos celíacos activos y enfermos celíacos tratados. El análisis de riqueza bacteriana mostró (Figura 9) la presencia de una media de 21 clústers diferentes (similar al número de géneros) por individuo en la parte alta del intestino delgado de pacientes  $\text{No-EC}_{AS}$ , 24 en  $\text{ECA}_{AS}$  y una riqueza reducida en pacientes  $\text{ECT}_{AS}$  (17 clústers diferentes).

La riqueza bacteriana también fue analizada en biopsias de la parte alta del intestino delgado en dos grupos de niños: sanos y enfermos celíacos activos. Los resultados mostraron (Figura 9) que la riqueza bacteriana observada en niños fue menor que la que aparece en individuos adultos, con una media de 13 clústers diferentes de bacterias por

individuo No-EC<sub>NS</sub> y 16 en ECA<sub>NS</sub>. Por lo tanto, los niños enfermos celíacos mostraron una riqueza mayor en comparación a los niños sanos.

El análisis estadístico mostró que existían diferencias significativas en la riqueza bacteriana entre los diferentes grupos (Figura 9). Mediante un análisis de ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) se determinó que las diferencias en riqueza entre las comunidades bacterianas podían ser explicadas mediante dos factores: la edad y la presencia del gluten en la dieta. Se han observado diferencias significativas entre el grupo de individuos adultos y el grupo de niños (No-EC<sub>AS</sub> vs. No-EC<sub>NS</sub>,  $p=0,004$ ; entre ECA<sub>AS</sub> vs. ECA<sub>NS</sub>,  $p=0,001$ ; entre No-EC<sub>AS</sub> vs. ECA<sub>NS</sub>,  $p=0,025$ ; No-EC<sub>NS</sub> vs ECA<sub>AS</sub>,  $p=0,000$ ), subrayando la edad como el principal factor. También se encontraron diferencias significativas en cuanto a riqueza entre ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub> ( $p=0,015$ ) (Figura 9). En este caso las diferencias se podrían deber a la presencia de gluten en la dieta y/o consecuencia de la inflamación del intestino.



**Figura 9.** Comparación de la riqueza observada entre individuos adultos y niños. La riqueza observada aparece expresada como el número medio de clústers con una distancia filogenética *Tamura-Nei* de 0,1 por individuo. Las flechas entre las columnas representan las diferencias significativas que existen entre las comunidades bacterianas de sujetos sanos, enfermos celíacos activos y enfermos celíacos tratados determinadas mediante un ANOVA.

### **1.5.3. El estudio de la diversidad de las comunidades determina que existen diferencias en función de la dieta y la edad**

Para estudiar la diversidad de las comunidades de bacterias se ha recurrido al empleo de diferentes estimadores (índice de Shannon-Wiener e índice de Simpson, Tabla 3 y 4). En la población de adultos, las comunidades de bacterias de individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub> presentaron, en general, índices de diversidad más altos que los de las comunidades de bacterias de ECT<sub>AS</sub>. Los análisis estadísticos mostraron que existían diferencias significativas en cuanto a diversidad entre las comunidades de bacterias asociadas a la población de adultos en función de la presencia o ausencia del gluten en la dieta ( $p < 0,05$ ; prueba U de Mann-Whitney). Al igual que ocurría con la riqueza, se observó también que existían diferencias significativas en la diversidad entre individuos ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>, que podría estar asociado o bien al daño intestinal o bien al contenido de gluten en la dieta ( $p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney). Ambas diferencias se observaron para distancias filogenéticas de 0,05 y 0,1. Para el resto de distancias filogenéticas no se observaron diferencias significativas.

Las comunidades de bacterias muestreadas en los niños presentaron índices de diversidad generalmente más bajos que las comunidades de bacterias asociadas a la población adulta (Tabla 3 y 4). Estas diferencias fueron significativas en cuanto a diversidad entre las comunidades de bacterias asociadas a individuos adultos sanos, las comunidades de individuos celíacos activos adultos, las comunidades de niños sanos y las comunidades de niños enfermos celíacos activos ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis). El factor que podría explicar las diferencias entre estas poblaciones es la edad ( $p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney).

A distancias filogenéticas altas (0,43) la diversidad estimada de las comunidades disminuyó drásticamente, de forma que esa distancia fue considerada demasiado grande para comprender las agrupaciones incluso a nivel de filo.

Distancia	Diversidad	No-EC <sub>A</sub> 1	No-EC <sub>A</sub> 2	No-EC <sub>A</sub> 3	No-EC <sub>A</sub> 4	No-EC <sub>A</sub> 5	ECA <sub>A</sub> 1	ECA <sub>A</sub> 2	ECA <sub>A</sub> 3	ECA <sub>A</sub> 4	ECA <sub>A</sub> 5	ECT <sub>A</sub> 1	ECT <sub>A</sub> 2	ECT <sub>A</sub> 3	ECT <sub>A</sub> 4	ECT <sub>A</sub> 5
0,01 <sup>a</sup>	D	0,031	0,02	0,015	0,041	0,027	0,017	0,025	0,031	0,031	0,021	0,018	0,022	0,239	0,118	0,102
	H'	3,171	3,34	3,503	3,041	3,332	3,361	3,314	3,181	3,198	3,316	3,434	3,352	2,026	2,457	2,473
0,05 <sup>a,b</sup>	D	0,05	0,075	0,043	0,148	0,038	0,036	0,034	0,046	0,082	0,033	0,064	0,053	0,391	0,123	0,373
	H'	2,855	2,789	3,075	2,292	3,131	3,017	3,119	2,941	2,803	3,146	2,724	2,948	1,511	2,362	1,644
0,1 <sup>a,b</sup>	D	0,053	0,083	0,073	0,158	0,045	0,042	0,036	0,07	0,087	0,044	0,073	0,069	0,391	0,124	0,373
	H'	2,805	2,66	2,786	2,197	2,972	2,944	3,058	2,705	2,736	2,979	2,589	2,76	1,511	2,336	1,617
0,2 <sup>a</sup>	D	0,102	0,099	0,104	0,198	0,117	0,095	0,136	0,162	0,176	0,076	0,109	0,126	0,47	0,138	0,533
	H'	2,33	2,388	2,433	1,931	2,229	2,376	2,138	1,945	2,116	2,542	2,249	2,295	1,232	2,193	1,09
0,3 <sup>a</sup>	D	0,182	0,17	0,196	0,33	0,414	0,314	0,237	0,574	0,216	0,243	0,185	0,284	0,501	0,191	0,538
	H'	1,703	1,813	1,712	1,297	1,234	1,428	1,532	0,872	1,737	1,617	1,674	1,492	1,065	1,698	0,997
0,43	D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	H'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 3.** Índice de dominancia de Simpson (D) e índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') para las comunidades de bacterias estudiadas de la población de individuos adultos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>), Los resultados se muestran considerando las distancias filogenéticas de 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,43. <sup>a</sup> Diferencias significativas asociadas a la edad. <sup>b</sup> Diferencias significativas asociadas a la dieta.

Distancia	Diversidad	No-EC <sub>N</sub> 1	No-EC <sub>N</sub> 2	No-EC <sub>N</sub> 3	No-EC <sub>N</sub> 4	No-EC <sub>N</sub> 5	ECA <sub>N</sub> 1	ECA <sub>N</sub> 2	ECA <sub>N</sub> 3	ECA <sub>N</sub> 4	ECA <sub>N</sub> 5	ECA <sub>N</sub> 6	ECA <sub>N</sub> 7	ECA <sub>N</sub> 8
0,01 <sup>a</sup>	D	0,047	0,045	0,08	0,138	0,09	0,065	0,024	0,095	0,059	0,039	0,072	0,044	0,119
	H'	3,041	3,099	2,662	2,299	2,6	2,853	3,322	2,622	2,909	3,058	2,877	2,94	2,587
0,05 <sup>a</sup>	D	0,082	0,099	0,111	0,145	0,129	0,099	0,055	0,166	0,087	0,081	0,103	0,087	0,133
	H'	2,704	2,641	2,313	2,166	2,169	2,507	2,922	2,157	2,598	2,576	2,607	2,511	2,314
0,1 <sup>a</sup>	D	0,097	0,122	0,112	0,151	0,209	0,12	0,069	0,196	0,099	0,089	0,114	0,087	0,157
	H'	2,485	2,335	2,286	2,05	1,783	2,273	2,751	1,963	2,427	2,48	2,405	2,511	2,193
0,2 <sup>a</sup>	D	0,185	0,163	0,157	0,163	0,406	0,174	0,118	0,242	0,136	0,115	0,146	0,134	0,182
	H'	2,007	2,091	2,01	1,944	1,326	2,014	2,282	1,59	2,1	2,217	2,125	2,271	1,942
0,3 <sup>a</sup>	D	0,318	0,298	0,33	0,34	0,5	0,245	0,215	0,362	0,238	0,407	0,267	0,239	0,497
	H'	1,281	1,313	1,252	1,179	0,96	1,571	1,577	1,176	1,545	1,187	1,483	1,559	0,95
0,43	D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	H'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 4.** Índice de dominancia de Simpson (D) e índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') para las comunidades de bacterias estudiadas de la población de niños no enfermos celiacos (No-EC<sub>N</sub>) y enfermos celiacos activos (ECA<sub>N</sub>). Los resultados se muestran considerando las distancias filogenéticas de 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,43. <sup>a</sup> Diferencias significativas asociadas a la edad.

## 1.6. Análisis comparativo de las comunidades de bacterias

Una vez estudiada cada comunidad de bacterias en cuanto a su composición y su diversidad  $\alpha$ , se realizaron distintos análisis comparativos para ver si existían diferencias entre estas comunidades utilizando la información filogenética de las mismas. Para ello, se empleó el software UniFrac (Lozupone & Knight, 2005) que emplea como información de partida el árbol filogenético (con distancias) construido con el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007) con todas las secuencias estudiadas procedentes de las distintas comunidades de bacterias.

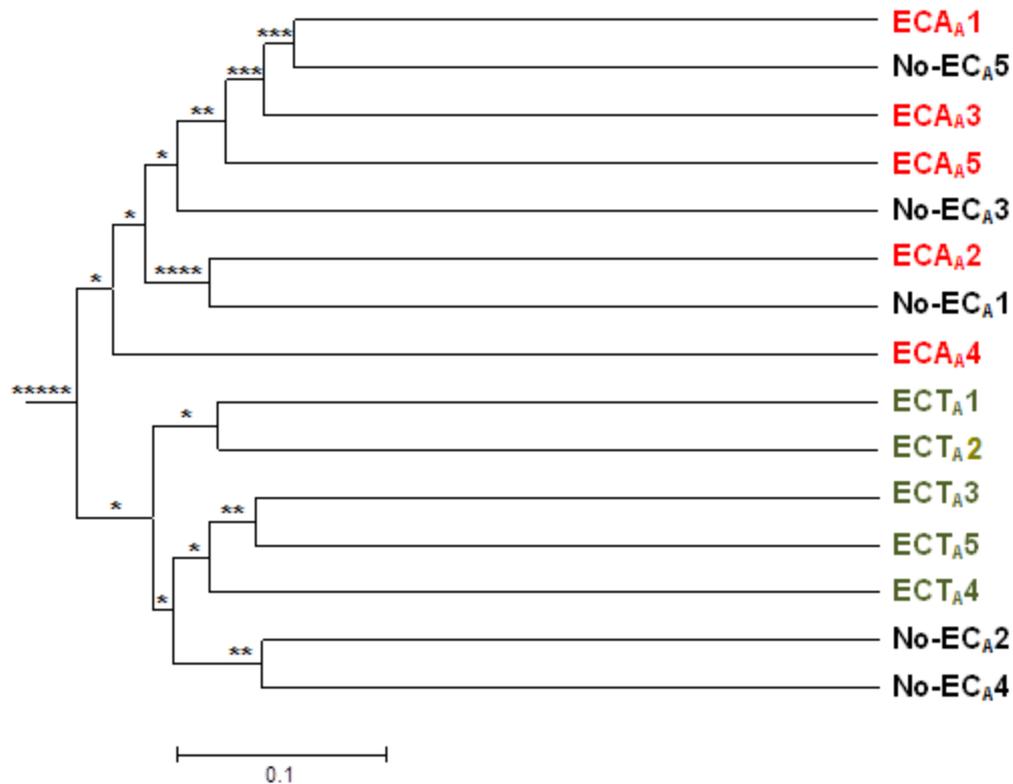
### 1.6.1. Análisis comparativo de las comunidades de bacterias de los tres grupos de adultos

Para determinar si existían diferencias significativas en la composición global de bacterias entre los tres grupos de adultos (sanos, enfermos celíacos activos y enfermos celíacos tratados) se empleó el test *UniFrac Significance*. Los resultados obtenidos cuando se compararon las tres comunidades conjuntamente y por parejas, determinaron que las diferencias eran significativas en ambos análisis (*UniFrac Significance* con corrección de Bonferroni  $p < 0,01$  y  $p \leq 0,03$  respectivamente). Sin embargo, cuando se analizó la composición global de cada comunidad individualmente, de forma que el resto de comunidades se consideraron en conjunto como una misma comunidad, los resultados indicaron que las comunidades de bacterias asociadas a pacientes ECA<sub>AS</sub> son significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ ) del resto de comunidades de bacterias presentes en pacientes ECT<sub>AS</sub> y No-EC<sub>AS</sub>.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis comparativo considerando individualmente las comunidades de bacterias de los 15 individuos adultos empleando también el test *UniFrac Significance*. Los resultados del análisis al comparar todas las comunidades conjuntamente, determinaron de nuevo que existían diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).

Mediante la aplicación *Cluster Environments* proporcionada por el software UniFrac, se desarrolló un análisis clúster jerárquico (UPGMA) de las 15 comunidades distintas de bacterias estudiadas de la población adulta (Figura 10). Las comunidades de bacterias asociadas a pacientes enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A1</sub>, ECT<sub>A2</sub>, ECT<sub>A3</sub>, ECT<sub>A4</sub> y ECT<sub>A5</sub>) se agruparon formando un clúster (valor de confianza  $< 50\%$ ) que se

separó de forma clara del clúster formado por las comunidades de bacterias de enfermos celíacos activos ( $ECA_A1$ ,  $ECA_A2$ ,  $ECA_A3$ ,  $ECA_A4$  y  $ECA_A5$ ) (valor de confianza  $<50\%$ ). El factor que determina esta agrupación podría ser la eliminación del gluten en la dieta y/o la recuperación del daño en la mucosa intestinal. Por el contrario, las comunidades de bacterias de individuos no enfermos celíacos aparecieron dispersas; no formaron un clúster independiente.



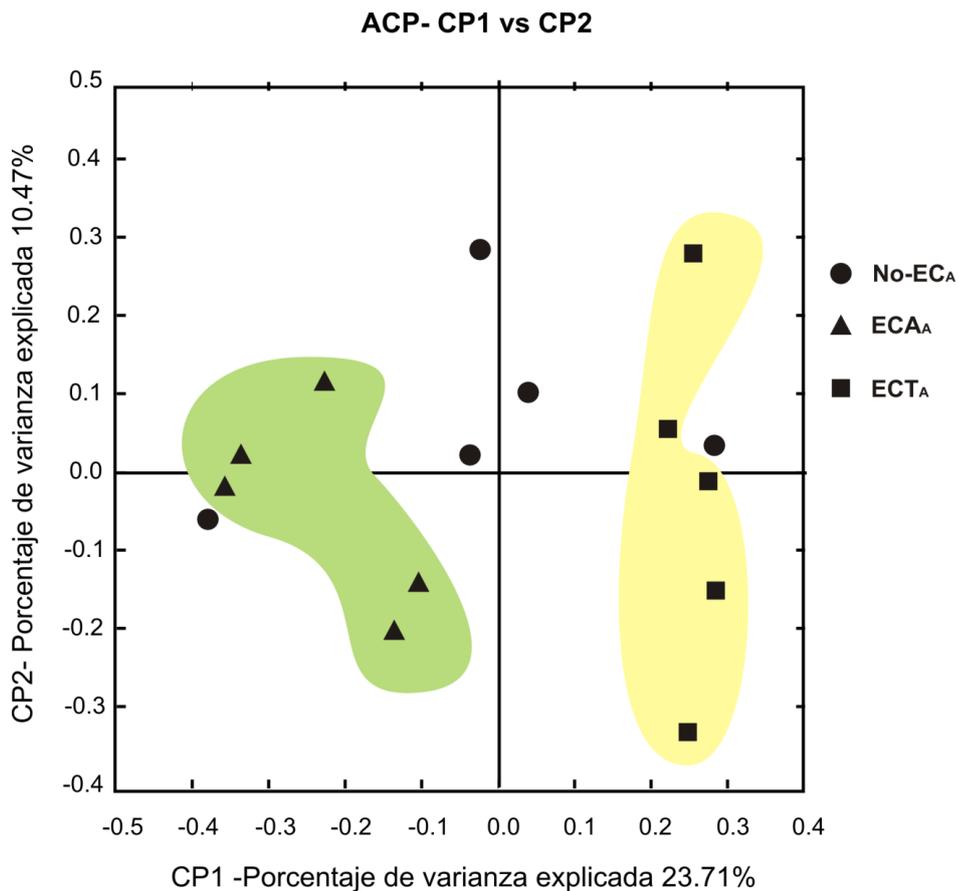
**Figura 10.** Análisis clúster jerárquico (UPGMA) de las comunidades de bacterias estudiadas de individuos no enfermos celíacos (No- $EC_A$ , negro), pacientes enfermos celíacos activos ( $ECA_A$  rojo) y pacientes enfermos celíacos tratados ( $ECT_A$ , verde). Se indica en los nodos el valor de confianza obtenido mediante la técnica Jackknife de remuestreo. \* $<50\%$ , \*\* $50-70\%$ , \*\*\* $70-90\%$ , \*\*\*\* $90-99\%$ , \*\*\*\*\* $>99,9\%$ .

Finalmente, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el objetivo de estudiar los factores que explican la variabilidad entre las distintas comunidades de bacterias. Este análisis se llevó a cabo utilizando la información filogenética de las comunidades estudiadas. En la Tabla 5, aparecen reflejados los porcentajes de variabilidad entre comunidades explicado por los seis primeros ejes principales (componentes principales).

Eje	I	II	III	IV	V	VI
<b>Varianza Explicada (%)</b>	23,71	10,47	9,29	8,56	7,96	6,62

**Tabla 5.** Resultado del Análisis de Componentes Principales (ACP). Se presenta el porcentaje de la varianza explicada por los seis primeros ejes o dimensiones.

La comparación entre las 15 comunidades de bacterias diferentes de adultos mediante ACP determinó la formación de dos grupos o clústers (ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>) en función del Componente Principal 1 (CP1) (Figura 11). Por el contrario, las comunidades bacterianas de los individuos No-EC<sub>AS</sub> aparecieron de forma dispersa a lo largo del CP1. El porcentaje de varianza explicada por este componente principal (23.71%) mostró una clara separación de las comunidades bacterianas en función de la existencia del tratamiento en pacientes con enfermedad celiaca.



**Figura 11.** Comparación entre cinco individuos sanos adultos (No-EC<sub>AS</sub>), cinco enfermos celiacos activos adultos (ECA<sub>AS</sub>) y cinco enfermos celiacos tratados adultos (ECT<sub>AS</sub>) mediante un Análisis de Componentes Principales. El porcentaje de varianza explicada para cada Componente Principal aparece indicado en cada eje. Las áreas sombreadas muestran el agrupamiento de las muestras en función del tratamiento.

El resto de componentes principales, el porcentaje de varianza explicada es relativamente bajo, y no aporta información a cerca de la variabilidad de las comunidades.

### **1.6.2. Análisis comparativo de las comunidades de bacterias de niños sanos y enfermos celíacos**

También se llevaron a cabo distintos análisis comparativos para ver si existían diferencias significativas entre las comunidades de bacterias de la población de niños, a partir de la información filogenética de las mismas. Solamente se encontraron diferencias significativas mediante el test *UniFrac Significance* cuando se comparó la composición global de bacterias en niños sanos y niños enfermos celíacos activos ( $p \leq 0,01$  con la corrección de Bonferroni).

El análisis comparativo considerando individualmente las comunidades de bacterias de los 13 individuos niños mediante ACP no mostró ningún factor claro que pudiese explicar la variabilidad entre las distintas comunidades de bacterias.

### **1.6.3. Análisis comparativo entre las comunidades de bacterias de niños y adultos**

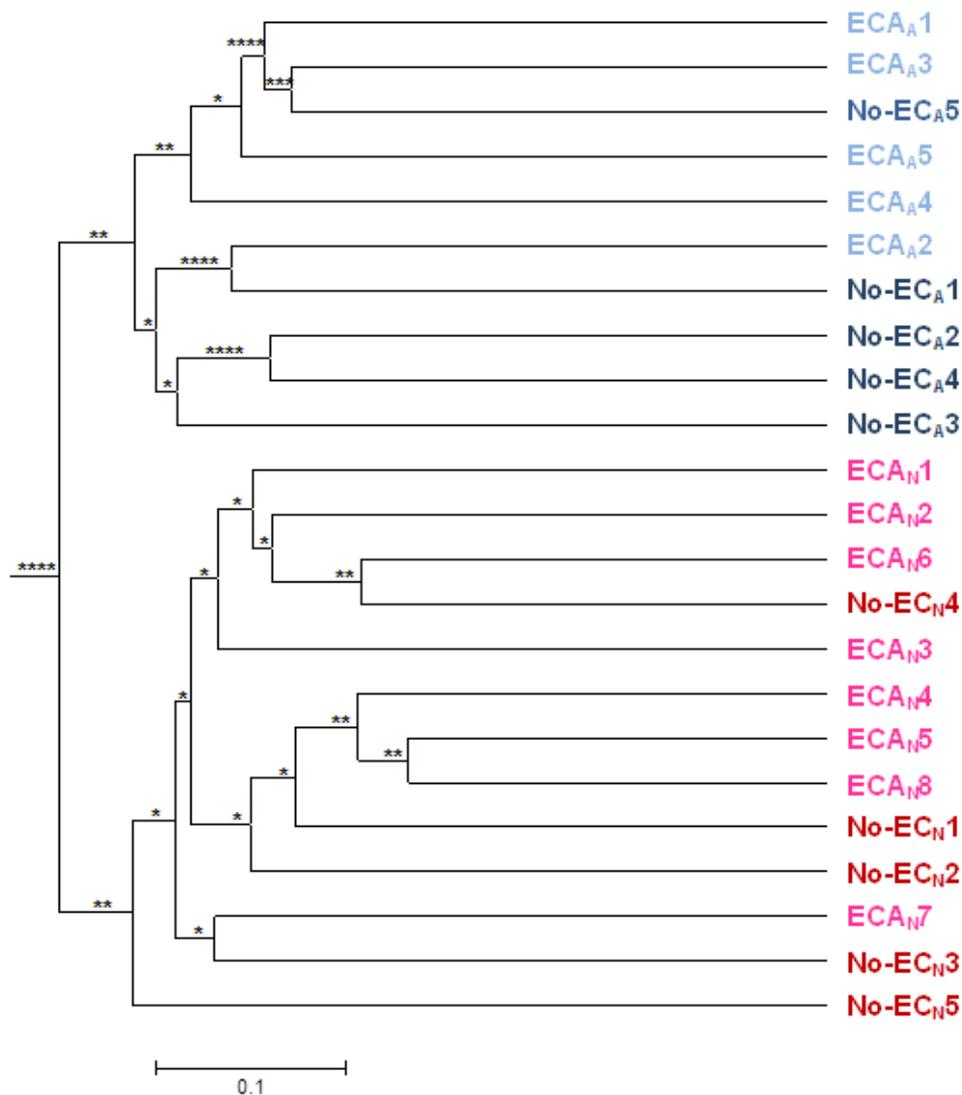
Finalmente, se llevó a cabo un análisis comparativo entre las comunidades de bacterias presentes en la población de niños y en la población de adultos. El test *UniFrac Significance* mostró que la composición global de las comunidades de bacterias de ECA<sub>AS</sub>, No-EC<sub>AS</sub>, ECA<sub>NS</sub> y No-EC<sub>NS</sub> fue significativamente diferente ( $p \leq 0,01$  con la corrección de Bonferroni).

Por otro lado, se compararon también individualmente las comunidades de los 23 individuos (adultos y niños) No-EC y ECA empleando el test *UniFrac Significance*. Los resultados del análisis al comparar todas las comunidades conjuntamente, determinaron de nuevo que existían diferencias significativas ( $p \leq 0,01$  con la corrección de Bonferroni).

El análisis clúster jerárquico (UPGMA) de las distintas comunidades de bacterias estudiadas mostró (Figura 12) que las comunidades asociadas a la población de adultos se separaron de forma clara de las comunidades correspondientes a la población de niños (valor de confianza del nodo mayor del 99,9%, técnica de Jaknife de remuestreo).

Dentro del clúster formado por las comunidades de bacterias de la población adulta, se observó la formación de dos subgrupos (valor de confianza entre 50-70%), uno formado por la gran mayoría de las comunidades de bacterias correspondientes a ECA<sub>A</sub> (ECA<sub>A1</sub>, ECA<sub>A3</sub>, ECA<sub>A5</sub> y ECA<sub>A4</sub>) y otro correspondientes a las comunidades de bacterias de individuos No-EC<sub>A</sub> (No-EC<sub>A1</sub>, No-EC<sub>A2</sub>, No-EC<sub>A4</sub> y No-EC<sub>A3</sub>) (Figura 12). El factor que determina esta agrupación podría ser el estado de salud (sano o enfermo).

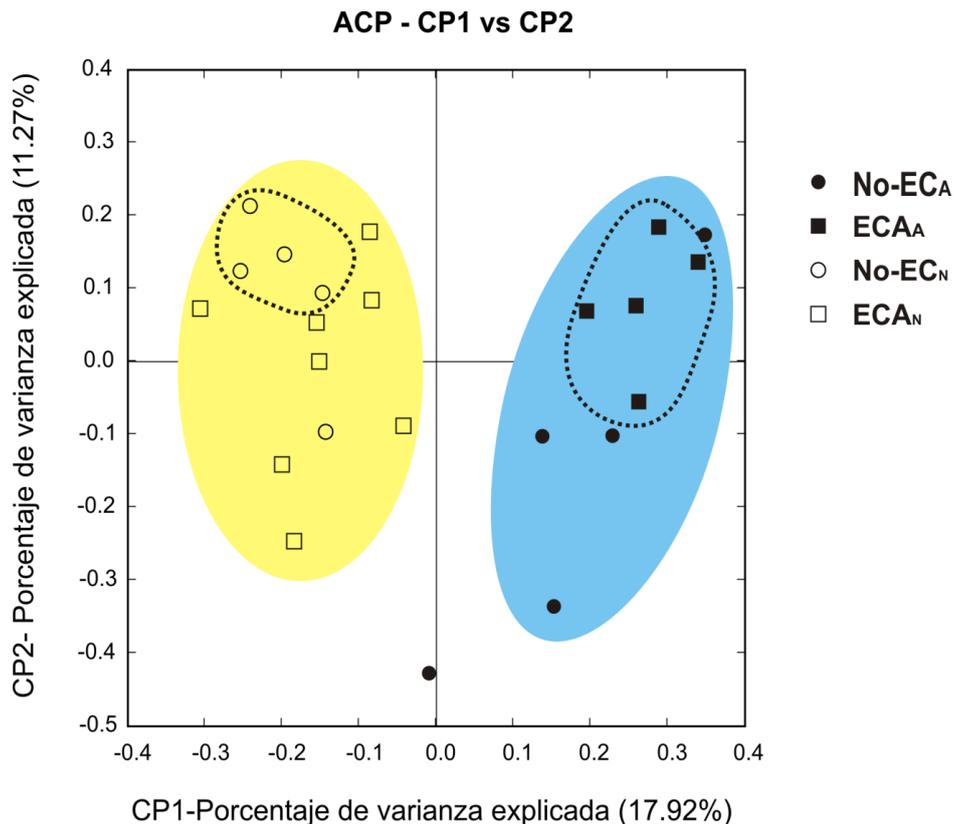
En las comunidades de bacterias de los niños no se observó la formación clara de ningún clúster.



**Figura 12.** Análisis clúster jerárquico (UPGMA) de las comunidades de bacterias estudiadas de adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>, azul oscuro), adultos enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub> azul claro), niños no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>, rojo) y niños enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>, rosa). Se indica en los nodos el valor de confianza obtenido mediante la técnica Jackknife de remuestreo. \* < 50%, \*\* 50-70%, \*\*\* 70-90%, \*\*\*\* 90-99%, \*\*\*\*\* > 99,9%.

Mediante ACP proporcionado por el software UniFrac, se compararon las comunidades de bacterias de 10 individuos adultos (No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub>) y 13 niños (No-EC<sub>NS</sub> y ECA<sub>NS</sub>). La Figura 13 muestra un agrupamiento de las muestras basado en la edad a lo largo del CP1. Este componente explica un 17,92% de la varianza total. Las zonas coloreadas denotan dos clústers distintos, uno para la población de adultos y otro para la población de niños (Figura 13).

Por otro lado, el CP2 sugiere un posible agrupamiento de las comunidades de bacterias de los ECA<sub>AS</sub> dentro de la población adulta (Figura 13). El factor que podría explicar este agrupamiento es la propia enfermedad. También en función de este componente, se observó que las comunidades de bacterias de los niños no enfermos celíacos se encuentran próximas, y en cambio las comunidades de bacterias de los niños enfermos se encuentran dispersas a lo largo del CP2 (Figura 13).



**Figura 13.** Comparación entre diez individuos adultos (no enfermos celíacos No-EC<sub>AS</sub> y enfermos celíacos activos: ECA<sub>AS</sub>) y trece niños (no enfermos celíacos No-EC<sub>N</sub> y ECA<sub>NS</sub>) mediante un Análisis de Componentes Principales. El porcentaje de varianza explicada para cada Componente Principal aparece indicado en paréntesis en cada eje. Las áreas coloreadas muestran el agrupamiento de las muestras en función de la edad. Las líneas discontinuas muestran a su vez dos subgrupos correspondientes a ECA<sub>A</sub> y No-EC<sub>N</sub>.

## 1.7. Discusión

Tradicionalmente, la parte alta del intestino delgado se ha considerado como un hábitat inapropiado para los microorganismos debido a su bajo pH, su rápido peristaltismo, la acción de lavado del quimo y la presencia de compuestos antimicrobianos, como enzimas proteolíticas o bilis (Wilson, 2005). El empleo de técnicas clásicas de cultivo, ha mostrado que la microbiota de la parte alta del intestino delgado está dominada por microorganismos orofaríngeos, como por ejemplo *Streptococcus* spp. y *Haemophilus* spp. Estos microorganismos, se encontraron únicamente en individuos sanos y no en pacientes con diversas patologías gastrointestinales (Sullivan *et al.*, 2003). Sin embargo, muchas de las bacterias no se cultivan fácilmente en el laboratorio (Torsvik *et al.*, 2002), por lo que es necesario recurrir al empleo de las técnicas moleculares para obtener una idea más detallada de la microbiota intestinal.

En este trabajo se muestra por primera vez (hasta donde nosotros conocemos) las posibles diferencias entre la microbiota duodenal de pacientes enfermos celíacos niños y adultos.

### 1.7.1. Las comunidades de bacterias presentes en la parte alta del intestino delgado de niños y adultos pertenecen a los filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*

En este estudio, se han empleado técnicas independientes de cultivo para estudiar la microbiota de la parte alta del intestino delgado de niños y adultos, sanos y enfermos celíacos. El empleo de estas técnicas moleculares determinó que las comunidades de bacterias presentes en la parte alta del intestino delgado de los individuos adultos y niños, pertenecen principalmente a los filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* y en menor proporción a otros filos como *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes estudios para determinar la diversidad de la microbiota del tracto gastrointestinal, y en todos ellos se ha destacado la presencia de estos filos (Eckburg *et al.*, 2005; Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2007; Tap *et al.*, 2009). En la población de los adultos, se encontraron diferencias significativas dentro del filo *Fusobacteria* y *Proteobacteria* que podrían ser explicadas por la presencia del gluten en la dieta. Sin embargo, no se han observado cambios en la proporción de bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes* o *Bacteroidetes* entre individuos sanos y enfermos

celiacos, tal y como se ha descrito en las enfermedades inflamatorias intestinales. En varios trabajos se ha observado una reducción en la proporción de bacterias del filo *Firmicutes*, tanto en los pacientes con enfermedad de Crohn (Suau *et al.*, 2001; Gophna *et al.*, 2006) como en los pacientes con colitis ulcerosa (Martinez *et al.*, 2008; Noor *et al.*, 2010). También se han mostrado cambios en la proporción de bacterias del filo *Bacteroidetes* en ambas enfermedades (Swidsinski *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2007; Noor *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011).

### **1.7.2. Las diferencias más importantes que se observan entre individuos adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) se deben a la dieta**

A partir de la construcción de librerías de clones de una región del ADNr 16S, se han identificado 89 géneros diferentes de bacterias en la parte alta de la mucosa del intestino delgado de individuos adultos. Dentro de la población de adultos estudiada predominaron las secuencias pertenecientes al género *Streptococcus* y *Prevotella*; Estos microorganismos, se han detectado también frecuentemente mediante técnicas clásicas de cultivo (Sullivan *et al.*, 2003). Además de estos géneros, también se han encontrado otros que podrían formar parte de la microbiota de la mucosa intestinal de los adultos, como por ejemplo *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium* y otros géneros que se han detectado con una frecuencia menor.

Dentro de la microbiota de la parte alta del intestino delgado de la población de adultos, también se han incluido microorganismos que no se pueden asignar a un género conocido. Estas bacterias de género desconocido no han sido previamente descritas como parte de la microbiota de la parte alta del intestino delgado de adultos. En este trabajo, se ha identificado la presencia de 7 bacterias de género desconocido que son detectadas frecuentemente en la mucosa del intestino delgado de individuos No-EC<sub>AS</sub> y de pacientes ECA<sub>AS</sub>. Esta población de OTUs podría cambiar debido al mantenimiento de la dieta libre de gluten, ya que la mayoría de ellos no se detectan en biopsias procedentes de pacientes ECT<sub>AS</sub>.

Dentro del grupo de los adultos, se han observado diferencias significativas a nivel de riqueza y diversidad. La riqueza bacteriana fue menor en adultos enfermos celíacos tratados (17 géneros diferentes) que en enfermos celíacos activos (21 géneros diferentes). Esta riqueza es mayor que la que se mostró en estudios previos basados en

métodos de cultivo (Sullivan *et al.*, 2003; Wilson, 2005). También se encontraron diferencias significativas en cuanto a diversidad entre ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>.

Los resultados han mostrado que el mantenimiento de una dieta libre de gluten tiene una gran influencia sobre la microbiota del intestino delgado: i) se han observado diferencias significativas en cuanto a riqueza y diversidad entre ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>; ii) el análisis de componentes principales, determinó que las comunidades de bacterias de los ECT<sub>AS</sub> forman un clúster separado de las comunidades de bacterias de los ECA<sub>AS</sub>; iii) mediante el análisis UPGMA se observó que las comunidades de bacterias asociadas a los pacientes ECT<sub>AS</sub> se agrupan formando un clúster distinto al clúster formado por las comunidades de bacterias de los pacientes ECA<sub>AS</sub>; iv) los pacientes ECT<sub>AS</sub> mostraron una población de bacterias de género desconocido diferente a las encontradas en los No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub>. Se ha descrito que la dieta influye en la composición y función de la microbiota intestinal y también ejerce un efecto importante sobre la salud del huésped, particularmente en los pacientes que sufren una intolerancia alimentaria (Dethlefsen *et al.*, 2006; De Palma *et al.*, 2009). Por este motivo los cambios que se observan en la microbiota de la mucosa intestinal de pacientes ECT<sub>AS</sub> se podría deber en parte al mantenimiento de una dieta libre de gluten. Sin embargo, parte de estas diferencias que se observan en las comunidades de bacterias de los pacientes ECT<sub>AS</sub>, también podrían ser una consecuencia de los cambios que tienen lugar en ese microambiente, como por ejemplo el restablecimiento de la homeostasis o la recuperación de la mucosa intestinal. Quizás, esta recuperación afecte a la composición del mucus y de este modo se vean también afectadas las bacterias que se asocian a él (Johansson *et al.*, 2010). Si es cierto, que las comunidades de bacterias están respondiendo a esa recuperación de la mucosa, podríamos esperar una mayor similitud entre las comunidades de bacterias de los individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub> que cuando se comparan las comunidades de bacterias de No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub>. Por ejemplo, *Prevotella* se detectó de forma reducida en las comunidades de bacterias de los ECA<sub>AS</sub>, mientras que los ECT<sub>AS</sub> presentaron rangos similares de detección de *Prevotella* que los individuos No-EC<sub>AS</sub>. Un patrón similar se obtuvo para el género *Streptococcus*, que presentó una detección reducida en pacientes ECA<sub>AS</sub> y una mayor detección en individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>. Por el contrario, las especies del género *Streptococcus* aparecieron de forma predominante en la mucosa inflamada de pacientes con enfermedad de Crohn (Fyderek *et al.*, 2009).

### 1.7.3. *Streptococcus* y *Prevotella* muestran el mismo patrón en los niños que en los adultos.

A partir de la construcción de librerías de clones de una región del ADN<sub>r</sub> 16S, se han identificado 46 géneros diferentes de bacterias en la parte alta de la mucosa del intestino delgado de una población de niños. La mayoría de las secuencias pertenecieron a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella* y *Neisseria* y en menor proporción aparecieron los géneros *Veillonella*, *Granulicatella*, *Acinetobacter* y *Haemophilus*. Se encontraron algunas diferencias con respecto a la microbiota duodenal de los adultos, como por ejemplo *Acinetobacter*, pero por lo general, los géneros dominantes fueron muy similares. Ou *et al.* (2009), llevaron a cabo en niños suecos una caracterización a nivel de género de la microbiota del intestino delgado proximal y sus resultados fueron bastantes similares a los obtenidos en nuestro estudio con niños españoles. También destacaron la predominancia del género *Streptococcus* en la microbiota del intestino delgado proximal. En nuestro trabajo, se observó un patrón similar al de los adultos en las secuencias de *Prevotella* y *Streptococcus*, que de nuevo aparecían con alta frecuencia en los No-EC<sub>NS</sub> y con una detección menor en los ECA<sub>NS</sub>, sugiriendo por tanto que estas poblaciones de bacterias se encuentran afectadas por los cambios que tienen lugar en el ecosistema del intestino delgado proximal en la EC. Otros géneros podrían también manifestar este patrón, pero el esfuerzo de secuenciación no fue suficiente para detectar estos cambios.

Por otro lado, la microbiota presente en la parte alta del intestino delgado de los niños con enfermedad celiaca en estado activo mostró una riqueza mayor de bacterias que la de los niños sanos, aunque estas diferencias no fueron significativas. Schippa *et al.* (2010), sí que encontraron una diversidad de bacterias significativamente mayor en la mucosa de los pacientes ECA<sub>NS</sub> mediante electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE). Propusieron que este incremento podría suponer un impacto dañino sobre la homeostasis duodenal. Resultados similares fueron mostrados por Nadal *et al.* (2007), que mediante FISH acoplado a citometría de flujo observaron que la proporción total de bacterias fue significativamente mayor en pacientes enfermos celíacos en estado activo que en pacientes enfermos celíacos tratados o sanos.

Con respecto a la población de bacterias de género desconocido, se observó que los niños presentaron una diversidad menor que los adultos; Estas bacterias de género

desconocido tampoco han sido previamente descritas como parte de la microbiota de la parte alta del intestino delgado de los niños. Se ha destacado la presencia de la OTU 45, que se detectó con una frecuencia bastante alta en los niños No-EC y por el contrario no se observó en las comunidades de bacterias de los niños ECA. Esta bacteria de género desconocido, que está ausente en los niños enfermos celíacos, podría actuar como un probiótico o como un microorganismo promotor de la salud. Es necesaria la realización de más experimentos para determinar la importancia de esta bacteria.

#### **1.7.4. La edad es el factor principal que determina las diferencias entre los niños y los adultos**

Con este estudio nos hemos planteado si la enfermedad celíaca en sí misma provoca un cambio en la microbiota de la parte alta del intestino delgado o si por el contrario no manifiesta ningún efecto. Nosotros esperábamos encontrar una microbiota diferente debido a que el ambiente del intestino delgado de los pacientes enfermos celíacos activos es diferente al de los individuos sanos (hiperplasia de las criptas e inflamación). Se ha descrito en varias ocasiones cambios en la microbiota intestinal asociados a la inflamación de la mucosa. El ejemplo más conocido es el de las enfermedades inflamatorias intestinales (como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn), en las que se ha descrito el fenómeno de disbiosis intestinal (Neut *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2005). En este trabajo, en los adultos hemos encontrado diferencias significativas debidas al diagnóstico, en el número de secuencias de *Streptococcus* spp. entre los individuos sanos y los pacientes enfermos celíacos. El test *UniFrac Significance* determinó que existían diferencias significativas en la composición global de bacterias de los individuos adultos. El análisis UPGMA determinó que las comunidades de bacterias asociadas a los ECA<sub>AS</sub> se separan de las comunidades de bacterias de los individuos No-EC<sub>AS</sub>. El ACP mostró un agrupamiento de las comunidades de bacterias de los ECA<sub>AS</sub>, que a su vez aparecen de forma separada de las comunidades dispersas de bacterias de los adultos No-EC<sub>AS</sub> a lo largo del CP2. Hay que señalar que los individuos control no son sanos reales, ya que presentan otros síntomas intestinales diferentes; quizás esta sea la razón por la que no se agrupan las comunidades de bacterias de los individuos No-EC en el ACP. Algunos trabajos, sí que han mostrado cambios en determinados grupos bacterianos en la mucosa del intestino delgado de niños con enfermedad celíaca (Nadal *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2009b).

En nuestro estudio, la edad es el principal factor que determina las diferencias entre los niños y los adultos. Hemos encontrado que los niños tienen una riqueza y diversidad significativamente menor que los adultos y el ACP y el método UPGMA determina que las comunidades de bacterias de los niños se agrupan de forma separada de las comunidades de bacterias de los individuos adultos. Además se observa que los niños ECA tienen una microbiota duodenal diferente a la de los adultos ECA. De hecho, se ha demostrado que el microbioma del adulto y del niño presentan genes distintos para optimizar las estrategias de adquisición de los nutrientes con respecto a diferentes dietas (Kurokawa *et al.*, 2007; Laparra & Sanz, 2010).

## **2. ESTUDIO MOLECULAR DE LA MICROBIOTA DUODENAL CAPAZ DE CRECER EN UN MEDIO DE CULTIVO CON GLUTEN COMO ÚNICA FUENTE DE NITRÓGENO**

El gluten es el agente externo responsable de la “activación” de la EC. Aunque se postula que los microorganismos pueden ser importantes para la EC, existe un total desconocimiento sobre el papel que puede jugar la microbiota intestinal en el metabolismo del gluten en los humanos. Es por esto, que nos planteamos el estudio de los microorganismos capaces de crecer empleando las proteínas del gluten como única fuente de nitrógeno. Estas proteínas han de ser hidrolizadas y pueden o bien generar péptidos tóxicos o bien detoxificarlos.

Con esta finalidad, se cultivaron biopsias duodenales procedentes de niños y adultos, tanto de sanos como de enfermos celíacos en un medio de cultivo líquido diseñado en nuestro laboratorio, al que denominamos MCB (descrito en Materiales y Métodos). Tras 48 horas, se tomó una muestra de cada uno de los cultivos para llevar a cabo la extracción del ADN (Materiales y Métodos). La microbiota duodenal capaz de crecer en ese medio, fue caracterizada mediante PCR-DGGE empleando cebadores universales.

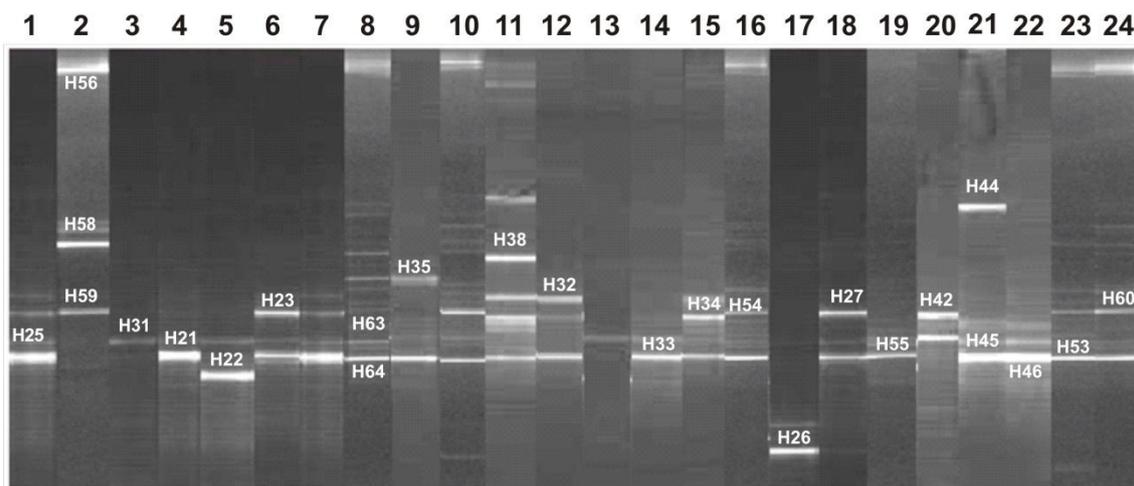
### **2.1. Análisis molecular mediante PCR-DGGE de la microbiota obtenida a partir del cultivo de biopsias duodenales**

Para llevar a cabo este análisis molecular se realizaron cultivos de la microbiota duodenal de 8 biopsias de individuos adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), 3 biopsias duodenales obtenidas a partir de pacientes adultos enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>), 5 biopsias procedentes de adultos enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>), 2 biopsias duodenales de niños no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>) y 6 biopsias duodenales de niños enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>) (Anexo 1). Todas estas muestras duodenales fueron diferentes a las empleadas en el apartado anterior.

Las biopsias se inocularon en 10 mL de medio MCB y se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones microóxicas. Tras la incubación, se extrajo el ADN del cultivo, y mediante PCR se amplificó un fragmento del ADNr 16S utilizando dos parejas de

oligonucleótidos. Por un lado se emplearon los cebadores universales HDA1GC/HDA2 que amplifican un fragmento de aproximadamente 200 pb correspondiente a la región V3 del ADNr 16S (Anexo 2) y los oligonucleótidos F968GC/R1401 que dan lugar a un fragmento de aproximadamente 450 pb de la región V6-V8 del ADNr 16S (descritos en Materiales y Métodos) (Anexo 2). Una vez realizada la PCR a partir del ADN de cada uno de los cultivos, se hizo un análisis previo de los resultados obtenidos en geles de agarosa, cargando una alícuota de 5  $\mu$ L de cada muestra. Tras la tinción con bromuro de etidio, se observó que en todos los casos se obtenía una única banda del tamaño correspondiente.

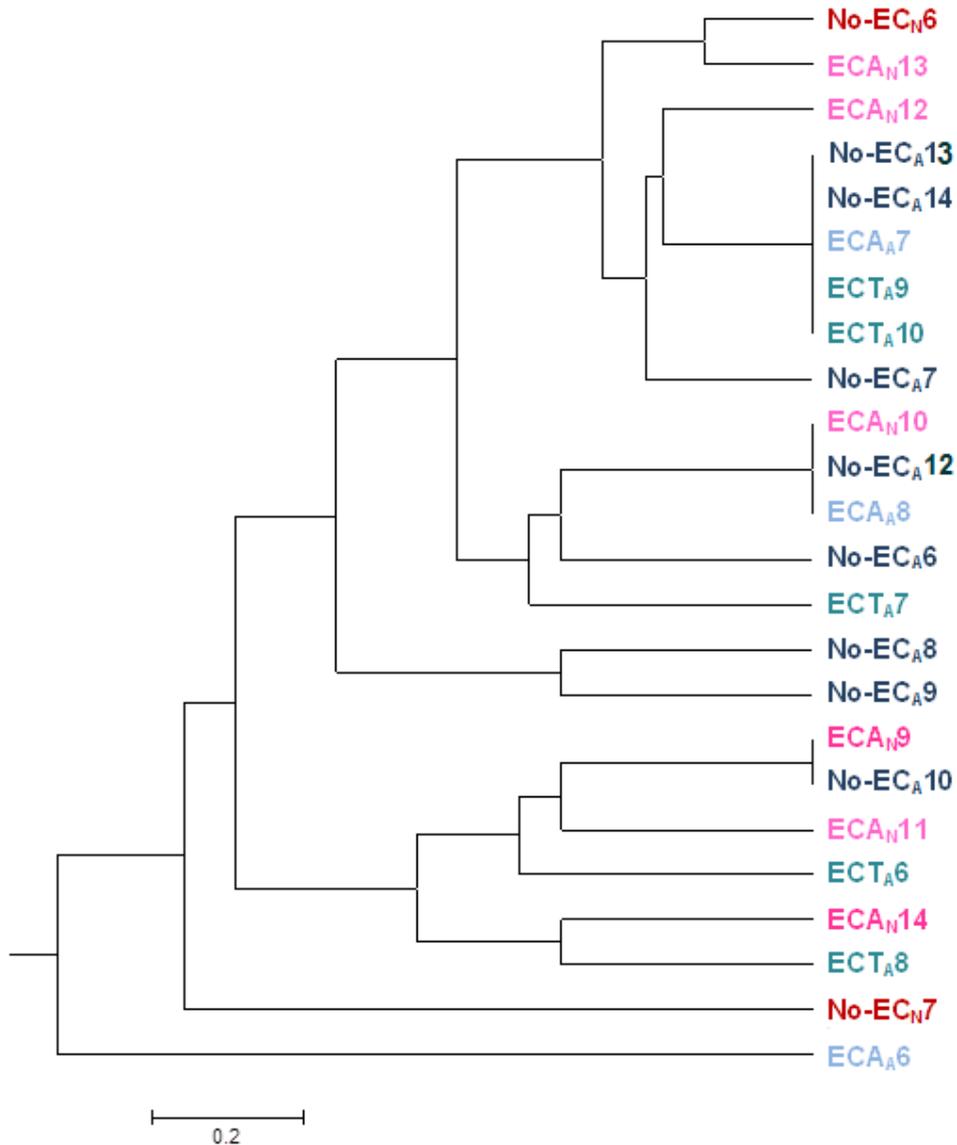
Los productos de PCR de la región V3 del ADNr 16S fueron separados mediante la técnica del DGGE en geles del 10% de acrilamida/bisacrilamida en un gradiente desnaturizante de urea y formamida (35-55%). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 70 V y una temperatura de 60°C durante 15 horas.



**Figura 14.** Perfiles de DGGE de las comunidades de bacterias obtenidas a partir del cultivo en un medio con gluten de biopsias procedentes de niños no enfermos celiacos (No-EC<sub>N</sub>) (carriles 1 y 2), niños enfermos celiacos activos (ECA<sub>N</sub>) (carriles desde el 3 al 8), adultos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>) (carriles del 9 al 16), adultos enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>) (carriles del 17 al 19) y adultos enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (carriles del 20 al 24). Los cebadores empleados para llevar a cabo la reacción de PCR fueron HDA1GC/HDA2. Los números indican los fragmentos secuenciados, cuya identificación se muestra en la Tabla 6.

En la Figura 14 se observan los perfiles de DGGE obtenidos a partir de los productos de PCR de la región V3 empleando como molde el ADN de los cultivos de biopsias duodenales. Los diferentes perfiles mostraron entre 1 a 5 bandas intensas y bien resueltas. El resto de las bandas eran tenues o daban lugar a un *smear*. No se observaron diferencias en cuanto a número de bandas entre individuos sanos y enfermos

celiacos, tanto activos como tratados. Ni tampoco se apreciaron diferencias asociadas a la edad. Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en el coeficiente de Dice. Debido a la simplicidad en los perfiles electroforéticos y que el número de individuos analizados de cada tipo fue muy bajo, no se observó ningún agrupamiento claro de las muestras en base a las diferentes variables del estudio (Figura 15).



**Figura 15.** Dendrograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos de DGGE del total de bacterias obtenidos a partir de muestras duodenales de niños no enfermos celiacos (No-EC<sub>N</sub>, rojo), niños enfermos celiacos activos (ECA<sub>N</sub>, rosa), adultos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>, azul oscuro), adultos enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>, azul claro) y adultos enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>, azul turquesa) empleando los cebadores universales HDA1GC/HDA2 basado en el índice de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA.

Por el contrario, si que se seleccionaron varias bandas para llevar a cabo su identificación molecular. Los productos de PCR que fueron identificados por secuenciación a partir de las bandas del DGGE aparecen en la Tabla 6. Para completar la identificación molecular de cada una de las bandas secuenciadas se llevó a cabo un análisis filogenético. La frecuencia de las diferentes especies detectadas mediante PCR-DGGE se muestra en la Tabla 7.

Bandas identificadas	Especie identificada	Identidad (%)
H22	<i>Bacillus cereus</i> (JF798687)	100
H26	<i>Clostridium perfringens</i> (AB627081)	100
H32	<i>Granulicatella elegans</i> o <i>G. adiacens</i> (JF803525)	100
H63	<i>Haemophilus influenza</i> (JF803592)	100
H35	<i>Lactobacillus crispatus</i> (AY335504)	100
H44	<i>Lactobacillus gasseri</i> (JF7200071)	100
H31	<i>Lactobacillus mucosae</i> (FR693800)	100
H56, H58	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (JF799903)	100
H38, H59	<i>Staphylococcus hominis</i> (JF799908)	100
H23, H27, H34, H42, H54, H60,	<i>Streptococcus oralis</i> o <i>S. mitis</i> (GU326240 o AF543291)	100
H21, H25, H33, H45, H46, H53, H55, H64	<i>Streptococcus salivarius</i> (JF803598)	100

**Tabla 6.** Especies del Dominio *Bacteria* identificadas a partir de la secuenciación de bandas de DGGE amplificadas a partir del ADN del cultivo de biopsias duodenales con los oligonucleótidos HDA1GC/HDA2. Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinado por la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

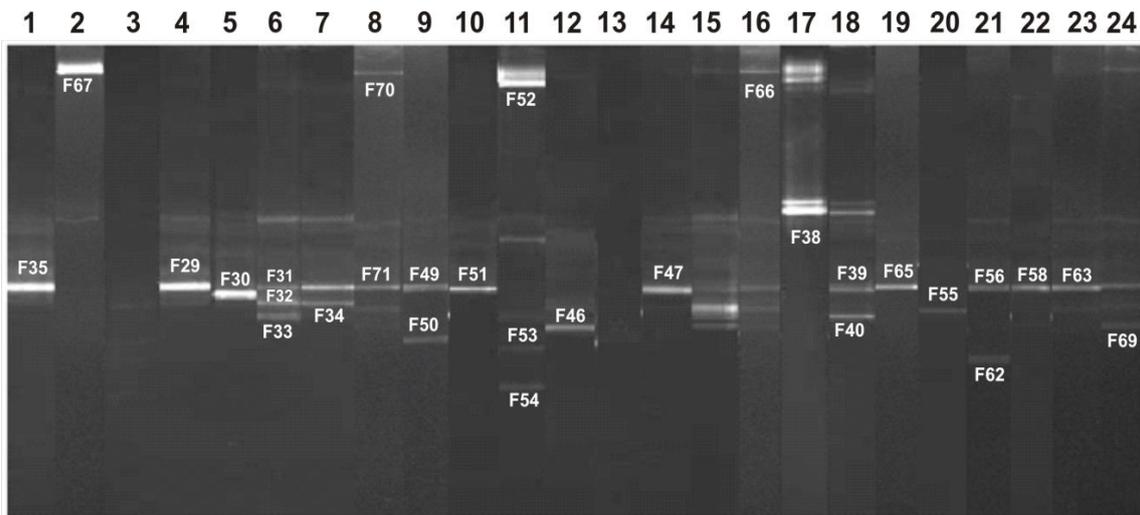
Grupo bacteriano	No-EC <sub>N</sub>	ECA <sub>N</sub>	No-EC <sub>A</sub>	ECA <sub>A</sub>	ECT <sub>A</sub>
	N=2	N=6	N=8	N=3	N=5
<i>Bacillus cereus</i>	0	1	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	1	0
<i>Granulicatella elegans</i> o <i>G. adiacens</i>	0	0	2	0	0
<i>Haemophilus influenza</i>	0	1	0	0	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0	1	0	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus mucosae</i> o <i>L. fermentum</i>	0	2	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	0	1	0	0
<i>Streptococcus oralis</i> o <i>S. mitis</i>	0	2	5	1	4
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	4	6	2	4

**Tabla 7.** Frecuencia de detección de las diferentes especies identificadas mediante PCR-DGGE empleando los cebadores universales HDA1GC/HDA2 a partir del ADN extraído del cultivo de biopsias duodenales de niños no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>), niños enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>), adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), adultos enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y adultos enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>).

Dentro de las diferentes especies identificadas, predominó *Streptococcus salivarius* y *S. oralis* que fueron detectados en prácticamente todos los individuos, tanto niños como adultos independientemente de la enfermedad. Por el contrario, *Bacillus cereus*, *Haemophilus influenza*, *Lactobacillus mucosae* y *Staphylococcus epidermidis* sólo

fueron detectados a partir del cultivo de biopsias de niños, pero con una frecuencia muy baja. A partir del cultivo de biopsias procedentes de individuos adultos, también aparecieron con baja frecuencia especies como *Clostridium perfringens*, *Granulicatella elegans* o *G. adiacens*, *Lactobacillus crispatus* y *L. gasseri*.

Los productos de PCR generados por los cebadores F968GC/R1401 fueron separados mediante DGGE en geles del 8% de acrilamida/bisacrilamida en un gradiente desnaturalizante del 40-60% de urea y formamida. Como se observa en la Figura 16, los patrones de bandas de DGGE obtenidos con los cebadores universales correspondientes a la región V6-V8 del ADNr 16S, mostraron muy pocas bandas (entre 1 a 4 bandas), pero la gran mayoría estaban bien resueltas. No se pudo asociar ningún perfil electroforético a la enfermedad, ni tampoco se observaron diferencias en cuanto a número de bandas entre niños y adultos y entre sanos y enfermos. Dada la simplicidad de los perfiles de bandas obtenidos con los cebadores F968GC/R1401, no se llevó a cabo un análisis de agrupamiento.



**Figura 16.** Perfiles de DGGE de las comunidades de bacterias obtenidas a partir del cultivo de biopsias en un medio con gluten de niños no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>) (carriles 1 y 2), niños enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>) (carriles del 3 al 8), adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>) (carriles del 9 al 16), adultos enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) (carriles del 17 al 19) y adultos enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (carriles del 20 al 24). Los cebadores empleados para llevar a cabo la reacción de PCR fueron F968GC/R1401. Los números indican los fragmentos secuenciados, cuya identificación se muestra en la Tabla 8.

Se seleccionaron varias bandas para llevar a cabo su identificación molecular. Los productos de PCR que fueron identificados por secuenciación a partir de las bandas del DGGE aparecen en la Tabla 8. La frecuencia de cada una de esas bandas se muestra en

la Tabla 9. Los resultados fueron similares a los obtenidos con los cebadores que amplifican la región V3, ya que las especies identificadas fueron las mismas, con la aparición de algunas nuevas.

Bandas identificadas	Especie identificada	Identidad (%)
F30	<i>Bacillus cereus</i> (DQ884352)	100
F38	<i>Clostridium perfringens</i> (AB588015)	100
F66	<i>Gemella haemolysans</i> (JF803540)	100
F70	<i>Gemella sanguinis</i> (NR026419)	99
F32, F34, F46	<i>Granulicatella elegans</i> o <i>G. adiacens</i> (AB252689 o HM856620)	100
F50	<i>Lactobacillus crispatus</i> (FR683088)	99
F54, F62	<i>Lactobacillus gasseri</i> (GU454858)	99
F52, F67	<i>Staphylococcus hominis</i> (HQ908730)	99
F33, F40, F53, F55, F69	<i>Streptococcus oralis</i> (GU326240)	99
F29, F31, F35, F47, F49, F51, F56, F58, F63, F65, F71	<i>Streptococcus salivarius</i> (AB608747)	99
F39	<i>Streptococcus peronis</i> (EU156772)	98

**Tabla 8.** Especies del Dominio *Bacteria* identificadas a partir de la secuenciación de bandas de DGGE amplificadas a partir del ADN del cultivo de biopsias duodenales con los oligonucleótidos F968GC/R1401. Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinado por la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

Grupo bacteriano	No-EC <sub>N</sub> N=2	ECA <sub>N</sub> N=6	No-EC <sub>A</sub> N=8	ECA <sub>A</sub> N=3	ECT <sub>A</sub> N=5
<i>Bacillus cereus</i>	0	1	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	2	0
<i>Gemella haemolysans</i>	0	0	1	0	0
<i>Gemella sanguinis</i>	0	1	0	0	1
<i>Granulicatella elegans</i> o <i>G. adiacens</i>	0	4	2	0	2
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0	1	0	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	1	0	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	0	1	0	0
<i>Streptococcus oralis</i>	0	1	3	1	3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	5	6	1	3
<i>Streptococcus peronis</i>	0	0	0	1	0

**Tabla 9.** Frecuencia de detección de las diferentes especies identificadas mediante secuenciación de las diferentes bandas obtenidas empleando los cebadores universales F968GC/R1401 a partir del ADN extraído del cultivo de biopsias duodenales de niños no enfermos celíacos (No-EC<sub>N</sub>), niños enfermos celíacos activos (ECA<sub>N</sub>), adultos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), adultos enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y adultos enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>).

De nuevo, los fragmentos amplificados correspondientes a las especies *Streptococcus oralis* y *S. salivarius* aparecieron en prácticamente todos los individuos sanos y enfermos, independientemente de la edad. Por el contrario *Granulicatella elegans* o *G. adiacens* fue detectada en 4 de los 6 niños ECA y no aparece en ninguno de los niños sanos. El resto de las especies identificadas su frecuencia fue muy baja, ya que aparecían en tan solo una o dos de las biopsias analizadas (Tabla 11).

## 2.2. Análisis molecular de la microbiota obtenida a partir del cultivo de biopsias duodenales mediante la construcción de colecciones de clones del ADNr 16S

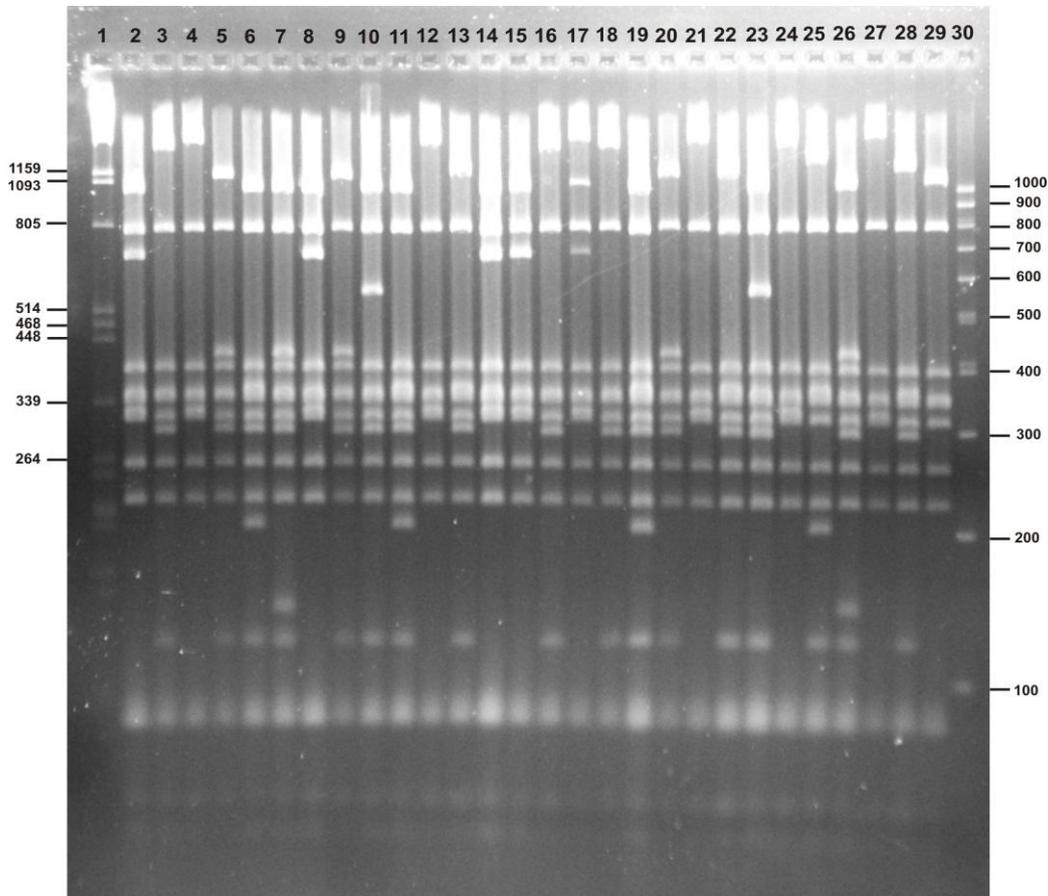
Se ha establecido que la técnica PCR-DGGE (Cocolin *et al.*, 2001; van Beek & Priest, 2002) es capaz de detectar las especies más abundantes de una comunidad, obviándose aquellas especies menos representadas. Por este motivo, se llevó a cabo la construcción de colecciones de clones del ADNr 16S para comprobar si los resultados obtenidos eran similares o por el contrario se detectaban nuevas especies que no habían sido identificadas mediante PCR-DGGE.

Para llevar a cabo la construcción de las colecciones de clones se seleccionaron 5 biopsias de las anteriores (No-EC<sub>A</sub>8, No-EC<sub>A</sub>14, ECA<sub>A</sub>8, ECT<sub>A</sub>7 y ECT<sub>A</sub>9; Anexo 1). Todas ellas pertenecieron a individuos adultos. A partir del ADN extraído de cada uno de los cultivos de las biopsias seleccionadas, se llevó a cabo una reacción de PCR empleando los cebadores 27F/E939R (descritos en Materiales y Métodos). Una vez amplificado el fragmento del tamaño correspondiente (aproximadamente 900 pb; Anexo 2) se construyeron la librerías de clones del ADNr 16S, subclonando el producto de PCR en el vector pSC-A-amp/kan. Se siguió el protocolo del kit *StrataClone PCR Cloning* de Stratagene (descrito en Materiales y Métodos). A continuación, se llevó a cabo la selección de transformantes que portaban el inserto de interés. Se seleccionaron alrededor de 100 colonias por cada paciente. Se extrajo el ADN plasmídico, y éste se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* que corta a ambos lados del producto de PCR que se ha subclonado en el plásmido.

La construcción de una librería de clones es una técnica larga y compleja, con un coste económico alto, por este motivo se intentó poner a punto un método que permitiese analizar un alto número de clones, pero con un menor esfuerzo de secuenciación. Con este objetivo se realizó un *fingerprint* con la enzima de restricción *Sau3AI* (cuya secuencia de reconocimiento es GATC) de los transformantes seleccionados por contener el inserto de 900 pb.

Una vez digeridos los plásmidos con *Sau3AI*, se analizaron en un gel de agarosa MS-8 del 3,5%. Los resultados mostraron (Figura 17) en todos los casos la presencia de 8 bandas comunes correspondientes a la digestión del vector con *Sau3AI*, y un número

variable de bandas específicas en función del inserto. En base a estos resultados, se determinó el número de perfiles diferentes de bandas, asumiendo que cada uno de ellos se correspondía con una especie diferente. En total se analizaron 453 clones de los 5 cultivos de biopsias y se observaron en total 13 perfiles de bandas diferentes.



**Figura 17.** ADN plasmídico digerido con *Sau3AI* de 28 clones seleccionados al azar de uno de los pacientes analizados (carriles desde el 2 al 29). Como marcador de peso molecular se empleó el ADN del fago  $\lambda$  digerido con *PstI* (carril 1) y el marcador de peso molecular PCR 100 pb *Low Ladder* de Sigma-Aldrich (carril 30).

En la Tabla 10 aparecen representados el número de clones de cada uno de los perfiles diferentes que se observaron a partir del ADN extraído del cultivo de las cinco biopsias analizadas.

Varios transformantes de cada uno de esos perfiles fueron purificados y enviados al servicio de secuenciación de la Universidad de León. Cada clon fue secuenciado por las dos cadenas. Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron editadas con el programa *BioEdit* y procesadas empleando el paquete informático DNASTAR (*EditSeq* y *Seqman*). Seguidamente, se llevó a cabo la búsqueda de secuencias similares empleando el algoritmo BLASTN.

Perfiles	No-EC <sub>A</sub> 8	No-EC <sub>A</sub> 14	ECA <sub>A</sub> 8	ECT <sub>A</sub> 7	ECT <sub>A</sub> 9
<b>P1</b>	4	34	32	32	43
<b>P2</b>	11	29	38	30	41
<b>P3</b>	9	8	0	0	8
<b>P4</b>	8	20	0	0	10
<b>P5</b>	0	0	0	0	1
<b>P6</b>	0	1	0	0	0
<b>P7</b>	0	1	0	0	0
<b>P8</b>	20	0	0	18	0
<b>P9</b>	13	0	0	12	0
<b>P10</b>	0	0	0	2	0
<b>P11</b>	14	0	0	0	0
<b>P12</b>	13	0	0	0	0
<b>P13</b>	1	0	0	0	0
<b>Total</b>	93	93	70	94	103

**Tabla 10.** Número de clones obtenido para cada uno de los perfiles diferentes de bandas a partir del DNA obtenido del cultivo de 2 biopsias de individuos adultos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>), de enfermos celiacos activos adultos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celiacos tratados adultos (ECT<sub>A</sub>).

La identificación de cada una de las secuencias fue completada mediante un análisis filogenético. Las mismas secuencias que fueron procesadas para la búsqueda con el algoritmo BLASTN se alinearon entre sí y con las secuencias seleccionadas en las búsquedas, empleando el programa *ClustalW*. Seguidamente, para llevar a cabo la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa informático MEGA versión 4, seleccionando el método *Minimum-Evolution* y como modelo de medición de las distancias, se eligió el modelo *Tamura-Nei*. Las secuencias fueron identificadas a nivel de especie.

A partir del árbol filogenético (Figura 18) se observó que no se podía asociar cada perfil de bandas a una única especie, sino que en algunos casos varios perfiles se correspondían a una especie determinada y por el contrario, en otros casos un mismo perfil se podía asociar a diferentes especies.

Las especies identificadas mediante esta técnica (8 especies distintas) fueron similares a las detectadas mediante PCR-DGGE (6 especies distintas), independientemente de los diferentes perfiles de bandas (Tabla 11). Incluso se detectaron algunas especies nuevas que no fueron detectadas mediante PCR-DGGE. Concluyendo, que la utilización de ambas técnicas, para llevar a cabo la caracterización molecular de la microbiota duodenal capaz de crecer en un medio de cultivo a base de gluten, daba lugar a resultados similares.



**Figura 18.** Árbol filogenético de los clones con los perfiles seleccionados. El árbol se ha construido de acuerdo al algoritmo *Minimum-Evolution*. En el nombre de cada clon se indica el perfil que presenta.

Paciente	Colección de clones (Digestión <i>Sau3AI</i> )	PCR-DGGE
No-EC <sub>A</sub> 8	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i> o <i>S.oralis</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
No-EC <sub>A</sub> 14	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i> o <i>S. mitis</i>
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Granulicatella adiacens</i> o <i>G. elegans</i>
	<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Gemella haemolysans</i>
ECA <sub>A</sub> 8	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
ECT <sub>A</sub> 7	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	No cultivada	
ECT <sub>A</sub> 9	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Granulicatella adiacens</i> o <i>G. elegans</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i> o <i>S.oralis</i>

**Tabla 11.** Comparación entre los resultados obtenidos a partir de la construcción de colecciones de clones y los resultados obtenidos mediante PCR-DGGE a partir del ADN del cultivo de biopsias de individuos no enfermos celiacos adultos (No-EC<sub>A</sub>), pacientes enfermos celiacos activos adultos (ECA<sub>A</sub>) y pacientes enfermos celiacos tratados adultos (ECT<sub>A</sub>).

### 2.3. Aislamiento e identificación de la microbiota duodenal capaz de crecer en un medio de cultivo con gluten

La microbiota identificada mediante PCR-DGGE y mediante las colecciones de clones en los apartados 2.1 y 2.2 está creciendo en un medio de cultivo con gluten como única fuente de nitrógeno. No se observó un patrón de especies bacterianas asociadas a la EC o a los individuos no enfermos celiacos. Por tanto, aunque comparten especies y otras son distintas, quizás la diferencia esté en la funcionalidad de las cepas que estén creciendo en ese medio. Para estudiar esas cepas se planteó su aislamiento, identificación y caracterización preliminar.

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron 4 biopsias de las anteriores (No-EC<sub>N</sub>7, No-EC<sub>A</sub>14, ECA<sub>A</sub>8, y ECT<sub>A</sub>9; Anexo 1). Inicialmente, las biopsias se inocularon en 10 mL de medio líquido MCB (descrito en Materiales y Métodos). Se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones microaeróbicas. Transcurrido ese tiempo, se plaquearon diluciones seriadas de los diferentes cultivos en placas que contenían el medio MCB sólido.

Después de incubar cada una de las diluciones en las mismas condiciones que antes, se hizo un análisis de *visu* de las distintas morfologías de las colonias crecidas en medio MCB sólido. Se aislaron entre 2 y 3 colonias de cada una de las morfologías que se observaron. El siguiente paso fue conseguir obtener cultivos puros de cada una de las morfologías. Para ello, se hicieron al menos tres siembras en aislamiento por agotamiento de cada colonia seleccionada.

Para realizar la identificación molecular de las bacterias presentes en las colonias seleccionadas, se extrajo el ADN de los cultivos puros. Seguidamente, se llevó a cabo una reacción de PCR empleando los oligonucleótidos 27F/E939R (descritos en Materiales y Métodos) (Anexo 2). Los productos de PCR de aproximadamente 900 pb fueron subclonados en el vector pSC-A-amp/kan. Se seleccionó un transformante para cada una de las morfologías, que después de purificar su ADN plasmídico, fue enviado al servicio de secuenciación de la Universidad de León. Las secuencias obtenidas fueron editadas y procesadas, para luego llevar a cabo la búsqueda de secuencias similares empleando el algoritmo BLASTN. Para completar la identificación molecular de cada una de las secuencias, se construyó un árbol filogenético con el programa informático MEGA versión 4.

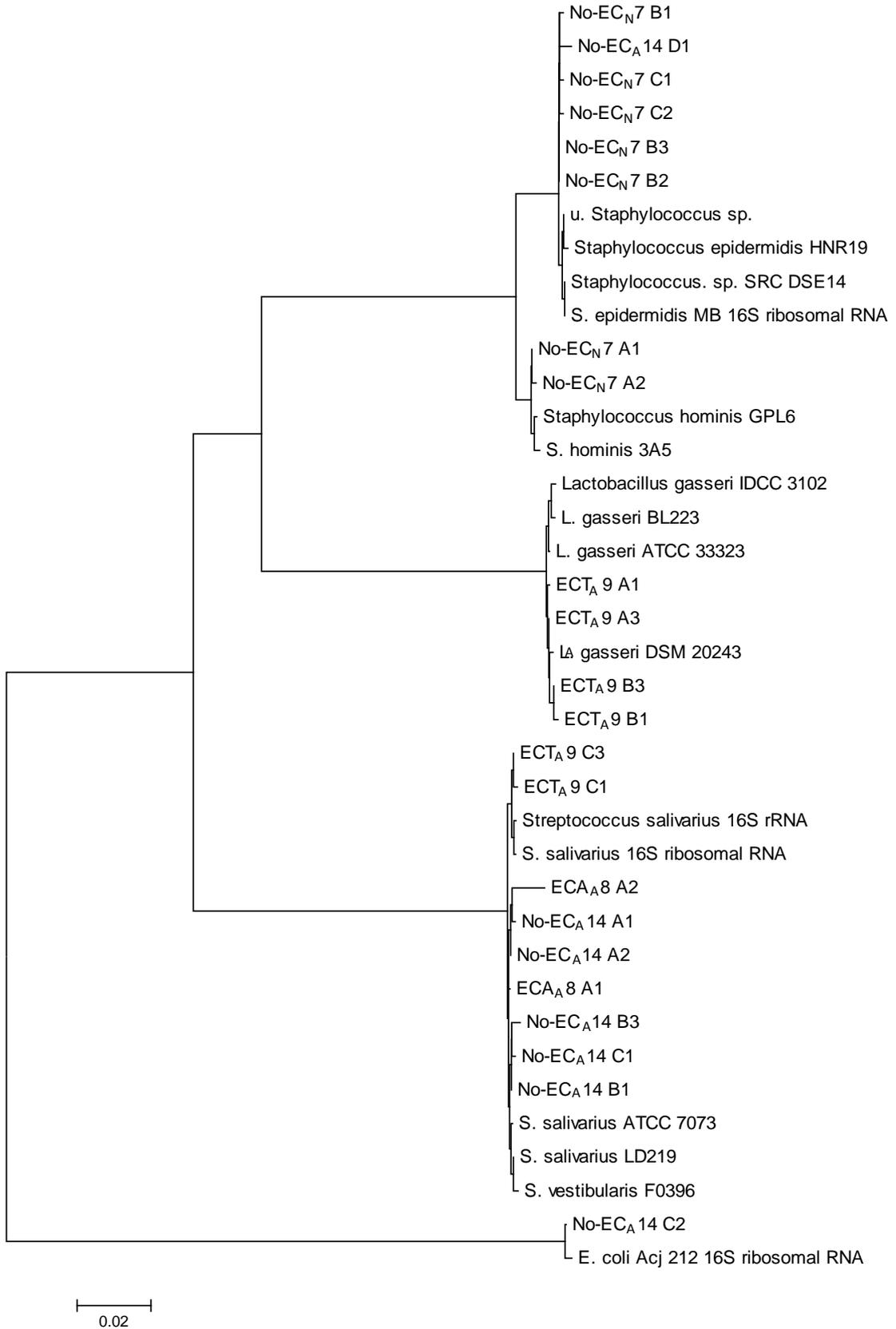
Los resultados obtenidos (Figura 19) a partir del análisis filogenético determinaron que la microbiota asociada al cultivo de biopsias duodenales en un medio de cultivo con gluten está dominada por los microorganismos: *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* y *Escherichia coli*. Estos resultados fueron similares a los obtenidos mediante PCR-DGGE y mediante la construcción de colecciones de clones (Tabla 12).

Una vez identificadas las diferentes colonias, se determinó la actividad proteolítica mediante bioensayo en placa frente a diferentes sustratos: gelatina, caseína y gluten. Las placas inoculadas con estos microorganismos se incubaron a 37°C durante 24 horas. Los microorganismos aislados a partir de pacientes sanos fueron *Staphylococcus hominis*, *S. epidermidis*, *Streptococcus salivarius* y *Escherichia coli*. Algunos de estos microorganismos (en particular las diferentes cepas de *S. hominis* y *S. epidermidis*) presentaron una actividad proteolítica intensa frente al gluten. También mostraron actividad proteolítica frente a la gelatina, aunque la intensidad frente a este sustrato varió en función de las diferentes cepas aisladas (Tabla 12). Los microorganismos

aislados a partir del paciente enfermo celiaco tratado no presentaron actividad proteolítica frente al gluten, pero si frente a la gelatina. Y por el contrario, a partir del paciente enfermo celiaco activo se aisló únicamente *Streptococcus salivarius* que no mostró actividad proteolítica, pero si fue capaz de crecer de forma dominante sobre un medio con gluten. Actualmente estamos llevando a cabo estudios distintos con estas cepas para determinar si son capaces de llevar a cabo la detoxificación completa del gluten.

Paciente	Morfologías seleccionadas (código)	Especie identificada	Gluten	Gelatina	Caseína
No-EC <sub>N</sub> 7	A1	<i>Staphylococcus hominis</i>	Si (+++)	Si (++)	No
	A2	<i>Staphylococcus hominis</i>	Si (+++)	Si (+++)	No
	B1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Si (+++)	Si (+)	No
	B2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Si (+++)	Si(+)	No
	B3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Si (+++)	Si(+)	No
	C1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Si (+++)	Si(++)	No
	C2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Si (+++)	Si(+++)	No
No-EC <sub>A</sub> 14	A1	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
	A2	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
	B1	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
	B3	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
	C1	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
	C2	<i>Escherichia coli</i>	No	No	No
	D1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Si (+++)	Si (+++)	No
ECA <sub>A</sub> 8	A1	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
	A2	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
ECT <sub>A</sub> 9	A1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	No	Si(++)	No
	A3	<i>Lactobacillus gasseri</i>	No	Si (+++)	No
	B1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	No	Si (+++)	No
	B3	<i>Lactobacillus gasseri</i>	No	Si (+++)	No
	C1	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No
	C3	<i>Streptococcus salivarius</i>	No	No	No

**Tabla 12.** Cepas identificadas de cada uno de los pacientes seleccionados. Se muestra las diferencias de actividad proteolítica frente a diferentes sustratos: gluten, gelatina y caseína. +++ actividad intensa, ++ actividad intermedia + actividad leve.



**Figura 19.** Árbol filogenético de las secuencias procedentes de las colonias aisladas a partir del cultivo de biopsias en medio MCB sólido. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo *Minimum-Evolution*.

## 2.4. Discusión

El gluten del trigo y proteínas similares del centeno y la cebada son los responsables del daño histológico a nivel duodenal que tiene lugar en la EC (Arentz-Hansen *et al.*, 2000). La microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica en el organismo humano, actuando en la digestión de componentes de la dieta, como polisacáridos complejos y, en menor medida, proteínas, entre las que se incluye el gluten (Caminero *et al.*, 2011). Pero, hay un conocimiento escaso sobre el papel que llevan a cabo los microorganismos sobre el metabolismo del gluten. En un estudio previo llevado a cabo por Bernardo *et al.* (2009), se describió por primera vez la existencia de un patrón específico de metaloproteasas bacterianas con capacidad de degradar gliadina en la mucosa duodenal de pacientes con EC. En consecuencia de este hecho y de acuerdo con las nuevas evidencias que señalan a una posible contribución bacteriana en el desarrollo de la EC (Forsberg *et al.*, 2004; Collado *et al.*, 2007; Nadal *et al.*, 2007, Sanz *et al.*, 2007a), nos planteamos estudiar molecularmente la microbiota desarrollada a partir del cultivo de biopsias en un medio que contenía gluten como única fuente de nitrógeno.

### 2.4.1. La microbiota duodenal identificada mediante PCR-DGGE a partir del cultivo de biopsias está dominada por *Streptococcus salivarius* y *S. oralis*

El análisis mediante PCR-DGGE mostró que la microbiota duodenal capaz de crecer en el MCB, un medio de cultivo a base de gluten como única fuente de nitrógeno, está dominada por *Streptococcus salivarius* y *S. oralis*, ya que fueron identificados en el 71% y 50% (respectivamente) de las biopsias analizadas. Varios estudios han descrito que determinadas cepas de *Streptococcus salivarius* pueden ser empleadas como probióticos, ya que son capaces de inducir una respuesta anti-inflamatoria y ejercer un efecto protector frente a la apoptosis inducida por patógenos (Cosseau *et al.*, 2008; Sliepen *et al.*, 2009). La predominancia de este género, también ha sido reflejada en varios trabajos que han empleando técnicas clásicas de cultivo para caracterizar la microbiota del duodeno (Sullivan *et al.*, 2003; Zilberstein *et al.*, 2007).

Otros géneros como *Lactobacillus*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Clostridium*, *Granulicatella* y *Staphylococcus* también se detectan mediante PCR-DGGE, aunque con una frecuencia más baja. Lo que caracteriza a todos estos microorganismos, es que son capaces de crecer sobre un medio de cultivo que contiene el gluten como única fuente de nitrógeno. Esto puede ser explicado por diferentes razones; i) porque presentan actividad

proteolítica frente al gluten; ii) por el contrario carecen de esa actividad, pero son capaces de crecer en ese medio gracias a los nutrientes que le aportan otros microorganismos que si son capaces de hidrolizar el gluten; iii) o su crecimiento se ve favorecido, porque son capaces de emplear los péptidos de menor tamaño que se originan como consecuencia de la digestión parcial del gluten con pepsina.

No se ha observado un perfil de especies bacterianas asociadas a la EC o a los individuos no enfermos celíacos. Quizás esto se deba a que los microorganismos presentes en el duodeno no pueden crecer en el medio de cultivo MCB. De hecho, en el apartado 1.3. de resultados de esta Tesis Doctoral se muestra que una parte importante de la microbiota duodenal de los adultos está formada por bacterias aún no cultivadas (que llamamos OTUs). A menudo, para el cultivo de microorganismos del tracto gastrointestinal se emplean medios de cultivo complejos (como por ejemplo *Brain Heart Infusion broth*, *Brucella broth*, etc.) (Yun *et al.*, 2005; Sainsus *et al.*, 2008) que se caracterizan por presentar hidrolizados de productos animales o vegetales, como caseína, carne, soja, extracto de levaduras u otras sustancias nutritivas que favorecen el crecimiento de muchos microorganismos. Sin embargo, el medio MCB carece de esos componentes, lo que hace que se trate de un medio de cultivo más exigente para el crecimiento de los microorganismos. También puede ocurrir que las condiciones de cultivo (pH, temperatura, oxígeno) no hayan sido las más idóneas y por este motivo podemos estar perdiendo información acerca de la microbiota que es capaz de crecer en un medio de cultivo a base de gluten.

#### **2.4.2. La construcción de una colección de clones, seguida de un *fingerprint* con *Sau3AI* supone un menor esfuerzo de secuenciación**

Se ha establecido que la técnica PCR-DGGE es capaz de detectar entre el 90-99% de las especies más representativas de una comunidad, sin discriminar entre células vivas, células muertas o células en un estado no cultivable. Sin embargo, esta técnica no refleja la presencia de otras especies de bacterias menos representativas que si pueden ser detectadas mediante colecciones de clones o mediante técnicas clásicas de cultivo (Cocolin *et al.*, 2001; van Beek & Priest, 2002). Por este motivo, a partir de la construcción de colecciones de clones, quisimos comprobar si se obtenían los mismos resultados o si por el contrario estábamos perdiendo información acerca de la microbiota que es capaz de crecer en el medio MCB.

Los resultados obtenidos a partir de la colección de clones (8 especies distintas) fueron similares a los obtenidos mediante PCR-DGGE (6 especies distintas). De hecho, se detectaron 2 especies que no habían sido identificadas mediante PCR-DGGE. *Streptococcus salivarius* predominó de nuevo en las 5 biopsias analizadas, junto con otros géneros como *Staphylococcus*, *Gemella* y *Lactobacillus* que aparecieron con una frecuencia menor.

La construcción de una colección de clones, es una técnica laboriosa ya que implica la secuenciación de un alto número de clones. En el apartado 1.1 de los resultados, por cada paciente se estudiaron alrededor de 50 clones y todos fueron enviados a secuenciar. En total, se secuenciaron 1.420 clones de los 28 individuos analizados, y esto supuso un alto coste económico, ya que cada secuencia tiene un precio aproximado de 6 euros. Para intentar reducir este coste, nosotros amplificamos un fragmento de 450 pb, que solamente fue secuenciado por una cadena. Pero esta reducción en el tamaño del fragmento amplificado, solamente nos permitió la identificación a nivel de género. Una vez obtenidas las secuencias, se lleva a cabo un proceso laborioso y largo de edición, alineamiento e identificación filogenética de las secuencias. Por este motivo, se intentó poner a punto un método que permitiese analizar un mayor número de clones, disminuyendo el esfuerzo de secuenciación. Para ello, se propuso seleccionar los clones en función de los diferentes perfiles de bandas obtenidos a partir de la digestión de los transformantes con la enzima de restricción *Sau3AI*. Se empleó esta enzima, ya que presenta una alta frecuencia de corte. Por cada paciente se estudiaron alrededor de 100 clones, de los cuales se enviaron a secuenciar 2 o 3 de cada uno de los perfiles diferentes que se observaron. En total, se analizaron 453 clones de los 5 cultivos de biopsias analizados y sólo se enviaron a secuenciar 52 clones. Esta reducción en el número de clones (aproximadamente 90%) enviados a secuenciar, nos permitió analizar un fragmento mayor del ADNr 16S (900 pb), permitiendo así la identificación de las secuencias a nivel de especie. Teniendo en cuenta estos aspectos, la metodología se puede considerar eficaz, ya que supone un ahorro de tiempo, una reducción en el coste económico y una mejoría en la identificación de las secuencias.

Sin embargo, el inconveniente que presenta esta técnica fue que a partir del árbol filogenético, se observó que no se podía asociar cada perfil de bandas a una única especie, sino que en algunos casos varios perfiles se correspondían a una especie determinada. Una posible explicación a este hecho, es que el número de copias del

operon ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15 copias (Klappenbach *et al.*, 2001). Por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 se ha descrito que presenta 5 copias del ADN<sub>r</sub> 16S (Zhang *et al.*, 2003) o *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 se caracteriza por presentar 6 copias del operon ribosomal 16S (Makarova *et al.*, 2006). En otros casos, un mismo perfil se podía asociar a diferentes especies, lo cual se podía deber a que la resolución de los geles de agarosa no fue la más adecuada, por lo que sería necesario incrementar el porcentaje de agarosa o emplear geles de acrilamida.

#### **2.4.3. *Staphylococcus hominis* y *S. epidermidis* mostraron actividad proteolítica frente al gluten**

Nosotros esperábamos encontrar un patrón de especies bacterianas asociadas a la EC diferente al de los individuos no enfermos celíacos. Sin embargo, la microbiota duodenal identificada mediante PCR-DGGE y mediante la construcción de una colección de clones a partir del cultivo de las biopsias, no mostró ningún cambio. Por este motivo, nos planteamos que quizás las diferencias estuvieran asociadas a la funcionalidad de las distintas cepas que son capaces de crecer en el medio MCB. Los enterotipos que determinan la microbiota intestinal, en la mayoría de los casos se definen por la composición de especies. Pero las funciones moleculares no siempre son llevadas a cabo por las especies más abundantes, por ello resulta necesario llevar a cabo también un análisis funcional para poder entender a las comunidades microbianas (Arumugam *et al.*, 2011).

A partir del cultivo de biopsias de individuos no enfermos celíacos se aislaron varios microorganismos y algunos de ellos, como *Staphylococcus hominis* y *S. epidermidis* presentaron actividad proteolítica intensa frente al gluten y en menor medida frente a la gelatina. Se ha descrito que *Staphylococcus epidermidis* expresa diferentes proteasas entre ellas, una glutamil-endopeptidasa. Esta enzima es una serín proteasa que actúa sobre el grupo carbonilo de la glutamina (Ohara-Nemoto *et al.*, 2002). La gliadina pertenece a una familia de proteínas ricas en prolina y glutamina y es el principal componente inmunogénico del gluten. El desarrollo de la EC esta sujeto a la presencia de péptidos tóxicos derivados de la fragmentación de las gliadinas, los cuales no pueden ser digeridos por las proteasas digestivas humanas (Morón *et al.*, 2008). *S. epidermidis*,

debido a esta actividad proteolítica podría detoxificar el gluten o por el contrario generar péptidos tóxicos. Por ello estamos llevando a cabo más estudios con estas cepas.

Por otro lado, los microorganismos aislados a partir del cultivo de biopsia del paciente enfermo celiaco tratado fueron *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus gasseri*. Ninguno de los dos manifestó actividad proteolítica frente al gluten, mientras que *Lactobacillus gasseri* mostró actividad proteolítica frente a la gelatina. El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas sobre el gluten ha estado sujeto a varios estudios (Di Cagno *et al.*, 2002; Rollan *et al.*, 2005; Rizzello *et al.*, 2007), y se ha descrito que determinadas cepas de bacterias ácido lácticas son capaces de degradar fragmentos de  $\alpha$ -gliadina (ricos en prolina), los cuales están implicados en el desarrollo de la EC (Gerez *et al.*, 2008). Otro ejemplo, es el probiótico VSL#3, constituido por la asociación de varias cepas del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, que además de llevar a cabo un efecto protector frente a la inflamación, también se ha descrito que presentan capacidad para hidrolizar los polipéptidos de gliadina responsables de la EC (De Angelis *et al.*, 2006). El hecho de que estas cepas aisladas de *Streptococcus* y *Lactobacillus* no sean capaces de degradar el gluten, se podría deber a que dicha actividad proteolítica sólo se manifieste en combinación con otras peptidasas liberadas por otras bacterias ácido lácticas.

A partir del cultivo de biopsia del paciente enfermo celiaco activo, se aisló únicamente la especie *Streptococcus salivarius*, que no presentó actividad proteolítica frente a ninguno de los sustratos bioensayados, pero sí fue capaz de crecer sobre el medio MCB de forma dominante. No se ha descrito que *S. salivarius* manifieste una actividad proteolítica extracelular fuerte (Delorme *et al.*, 2010). Al contrario de lo que ocurre con *S. thermophilus*, que está filogenéticamente muy próximo a *S. salivarius*. Este microorganismo, que se aísla frecuentemente de los productos lácteos, sí que presenta actividad proteolítica frente a la caseína de la leche. Probablemente la adquisición del gen que codifica para esa proteasa, haya sido adquirido por transferencia horizontal (Delorme *et al.*, 2010). Otras especies del género *Streptococcus*, también se ha descrito que presentan actividad proteolítica, como por ejemplo *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguinis* o *S. pneumoniae* (Lo & Hughes, 1996; Poulsen *et al.*, 1998). Todas estas especies no fueron aisladas a partir del cultivo en placa, pero sí se detectaron mediante PCR-DGGE y mediante la colección de clones. Esta ausencia de actividad proteolítica en los pacientes enfermos celíacos activos es contradictoria a los resultados obtenidos por Bernardo *et al.*

(2009) que describieron un patrón específico de metaloproteasas bacterianas con capacidad de degradar gliadina en la mucosa duodenal de pacientes con EC (tanto activos como tratados) que desaparecía en los pacientes control. Una posible explicación a este hecho es que dicha actividad realmente no sea bacteriana, sino que sea humana o bien que nuestro medio de cultivo y las condiciones de crecimiento no hayan sido las más adecuadas para poder detectar dicha actividad.

### **3. ESTUDIO MOLECULAR DE LA MICROBIOTA FECAL DE INDIVIDUOS ADULTOS MEDIANTE PCR-DGGE**

Varios trabajos han mostrado la presencia de grupos similares de bacterias en biopsias y muestras fecales (Collado *et al.*, 2009b; Kerckhoffs *et al.*, 2009), determinando por tanto que la microbiota fecal refleja parcialmente la microbiota asociada a la mucosa del intestino delgado. Por este motivo se llevó a cabo un estudio molecular de la población bacteriana presente en muestras fecales de individuos adultos y se determinó si existían diferencias entre la microbiota fecal de individuos sanos, enfermos celíacos activos y enfermos celíacos tratados. La microbiota fecal fue caracterizada mediante PCR-DGGE empleando cebadores universales y cebadores específicos de grupos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium*).

Para el análisis de las comunidades de bacterias presentes en las heces de individuos adultos se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de 11 muestras fecales procedentes de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), 10 muestras fecales obtenidas a partir de pacientes enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y 11 muestras fecales de pacientes enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (Anexo 1). Se siguió el protocolo del kit *QIAamp DNA Stool Mini* de Qiagen (descrito en Materiales y Métodos).

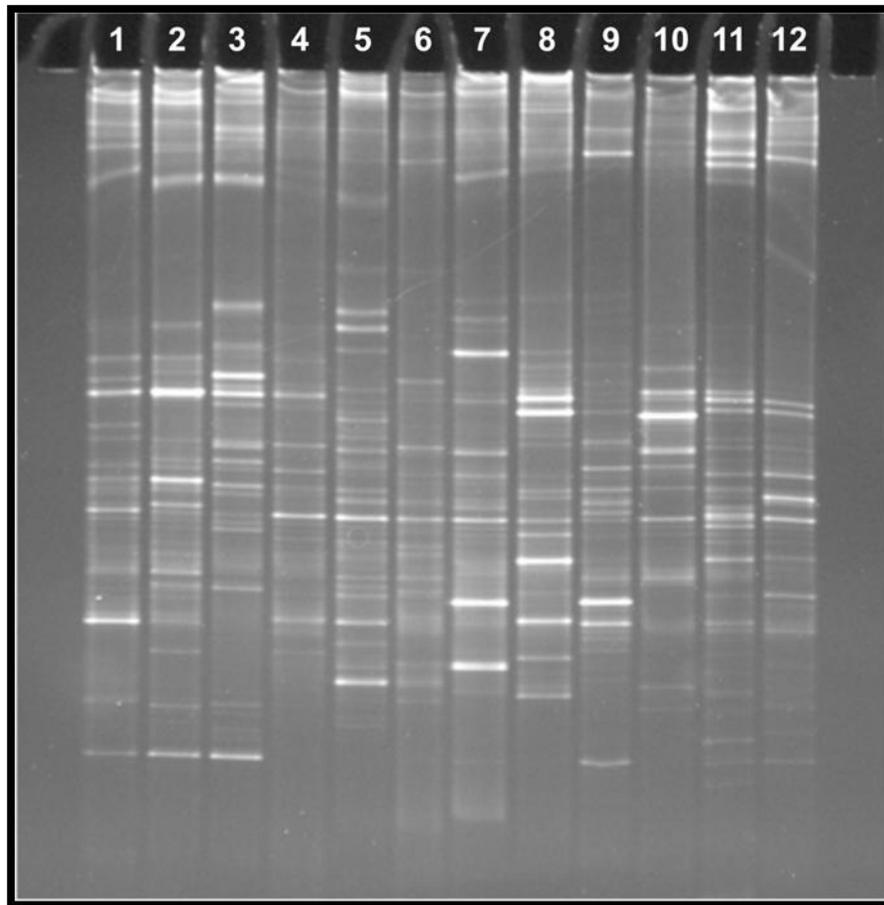
#### **3.1. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores universales**

El ADN extraído de las muestras fecales fue amplificado mediante PCR empleando los cebadores universales HDA1GC/HDA2 (descritos en Materiales y Métodos). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de unos 200 pb correspondiente a la región V3 del ADN<sub>r</sub> 16S (Anexo 2). Una vez realizadas las reacciones de PCR, se hizo un análisis previo de los resultados obtenidos en geles de agarosa, cargando una alícuota de 5 µL de cada muestra para comprobar que se obtenía una banda única de aproximadamente 200 pb.

Seguidamente, los productos de PCR generados con los cebadores HDA1GC/HDA2, fueron separados mediante la técnica del DGGE en geles del 10% de acrilamida/bisacrilamida en un gradiente desnaturizante de urea y formamida. Se probaron varios gradientes, empezando primeramente por un gradiente amplio entre el 0-100% y poco a poco se fue acortando, hasta que se alcanzó la separación óptima de

los productos de PCR con un gradiente desnaturante del 35-55% de urea y formamida. La electroforesis se llevó a cabo durante 15 horas a un voltaje constante de 70V y una temperatura de 60°C.

Los perfiles de DGGE (Figura 20) obtenidos a partir de los productos de PCR de la región V3 obtenidos con los cebadores universales fueron complejos y característicos para cada uno de los 32 individuos analizados. Sólo algunas bandas fueron comunes entre los diferentes carriles. Todos los perfiles presentaron bandas intensas y bien resueltas en la parte central del gel, pero también aparecían otras regiones que contenían bandas sin resolver o fragmentos separados débilmente, que por lo general se observaron en la parte alta del gel.



**Figura 20.** Perfiles de PCR-DGGE de las comunidades de bacterias obtenidos a partir de ADN de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>1, No-EC<sub>A</sub>2, No-EC<sub>A</sub>3, No-EC<sub>A</sub>4 y No-EC<sub>A</sub>5; carriles del 1 al 5), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>1, ECA<sub>A</sub>2, ECA<sub>A</sub>4 y ECA<sub>A</sub>5; carriles del 6 al 10) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>1 y ECT<sub>A</sub>2; carriles del 11 al 12).

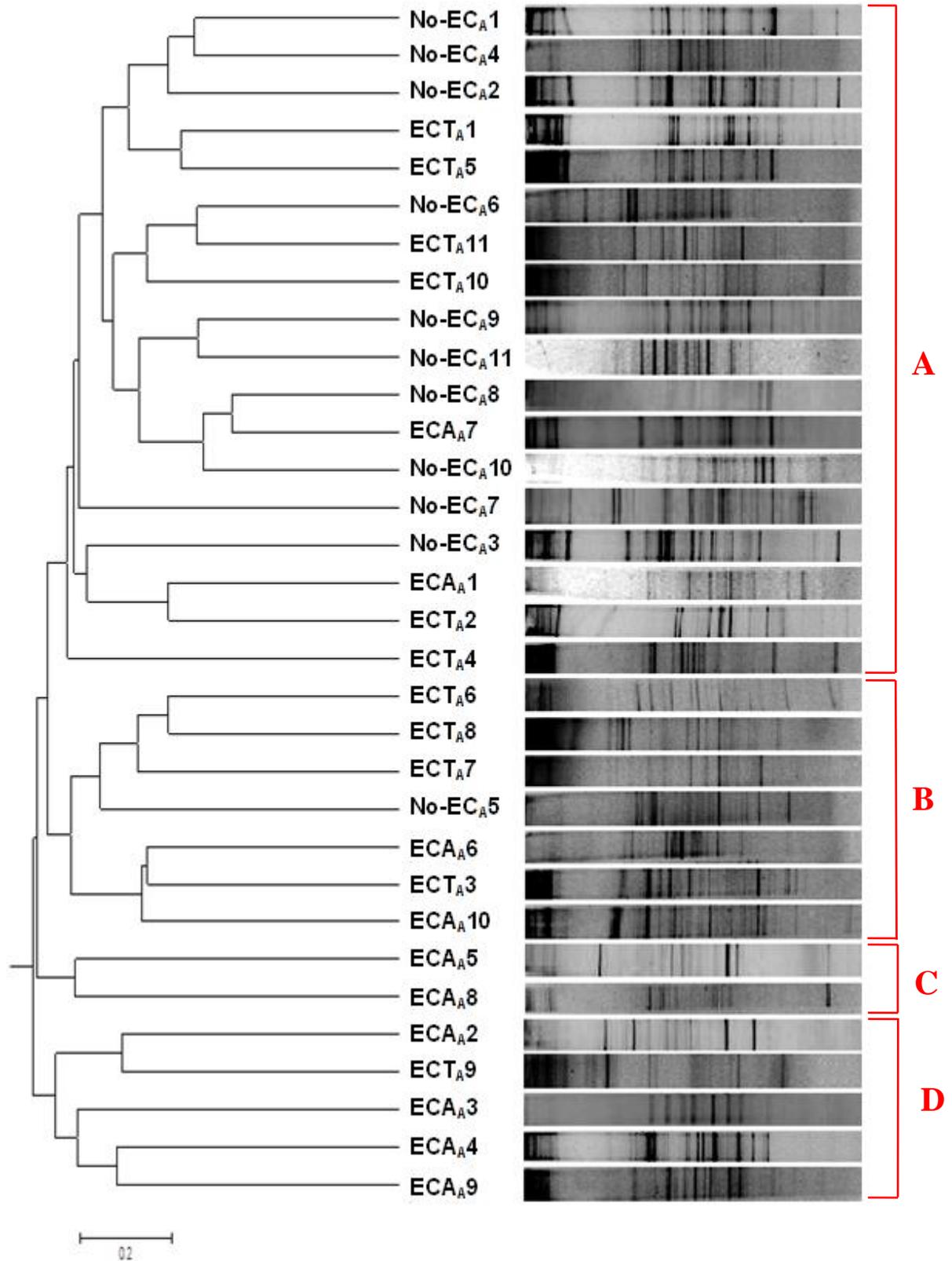
Se llevó a cabo un análisis comparativo para determinar la similitud entre los diferentes perfiles electroforéticos del DGGE empleando el método UPGMA mediante el coeficiente de Dice (descrito en Materiales y Métodos). Se obtuvo un dendograma que reflejó el agrupamiento de las comunidades de bacterias de las diferentes muestras fecales (Figura 20).

En el dendograma (Figura 21) se observó la formación de 4 clústers diferentes. El primer clúster (Figura 21; A) agrupó la mayor parte de los individuos No-EC<sub>AS</sub> (10/11), 2 pacientes ECA<sub>A</sub> (ECA<sub>A</sub>1 y ECA<sub>A</sub>7) y 6 pacientes ECT<sub>AS</sub> (ECT<sub>A</sub>1, ECT<sub>A</sub>5, ECT<sub>A</sub>11, ECT<sub>A</sub>10, ECT<sub>A</sub>2, y ECT<sub>A</sub>4). En los otros 3 clústers (Figura 21; B, C y D) se agruparon el resto de los pacientes enfermos celíacos tanto activos (8/10) como tratados (5/11).

Estos resultados subrayaron la presencia de una microbiota dominante asociada a los individuos control, y por el contrario los pacientes enfermos celíacos, independientemente del estado de la enfermedad, presentaron una microbiota dispersa en los 4 clústers. Gran parte de los pacientes ECT<sub>AS</sub> se asociaron a la microbiota de los individuos control, lo cual podría deberse a la recuperación de la mucosa tras el mantenimiento de una dieta libre de gluten.

El número de bandas de cada individuo en cada perfil de DGGE fue considerado como un indicador de la diversidad de la microbiota fecal. En los individuos control el número medio de bandas (media 14,09) fue mayor que en los pacientes enfermos celíacos activos (media 12,5) y los pacientes enfermos celíacos tratados (media 12,7), indicando que la microbiota fecal de los individuos control era más diversa que la microbiota de enfermos celíacos. Pero estas diferencias no fueron significativas al aplicar el test U de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

El análisis de las muestras fecales mediante DGGE empleando los cebadores universales HDA1GC/HDA2 proporcionó una visión generalizada de la diversidad de la microbiota fecal de individuos sanos y enfermos celíacos. Por tanto, para completar el estudio se caracterizó la microbiota presente en las muestras fecales mediante el empleo de oligonucleótidos específicos de grupo, que permitieron obtener una visión más profunda de cada una de las subpoblaciones analizadas.

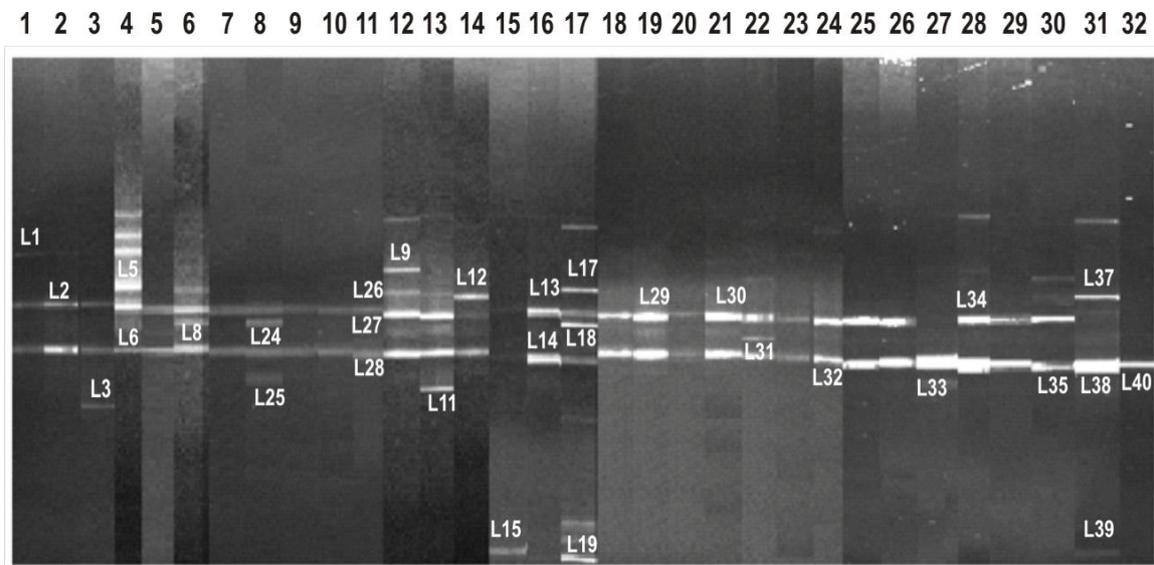


**Figura 21.** Dendrograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos de DGGE obtenidos con cebadores universales (HDA1GC/HDA2) a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) basado en el índice de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA. Las letras en rojo indican los diferentes clústers formados.

### 3.2. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo *Lactobacillus*

Se realizó el estudio por PCR-DGGE utilizando los cebadores específicos del grupo *Lactobacillus*. En general, los perfiles electroforéticos del DGGE a partir de los productos de PCR obtenidos con los cebadores Lac1 y Lac2GC, mostraron entre 1 a 7 bandas (Figura 22).

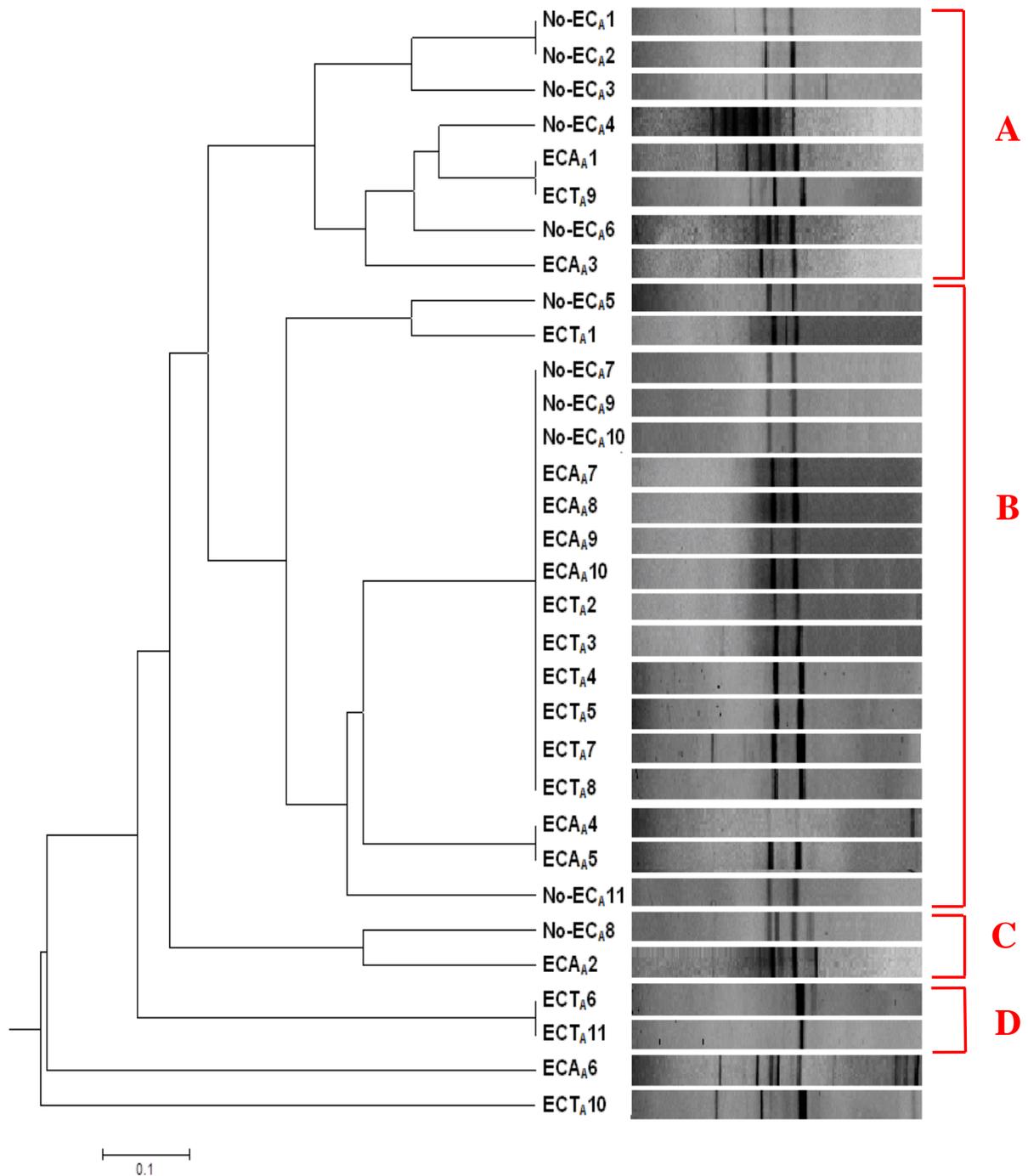
El perfil de bandas de los individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>) (número medio de bandas 3,5) y de los enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) (media 3,2) presentó una mayor diversidad de bacterias del grupo *Lactobacillus* que el perfil de bandas de los enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (media 2,3). Esta diferencia fue significativa ( $p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney) y podría ser explicada por el factor dieta. También se encontraron diferencias significativas en la diversidad entre los individuos No-EC<sub>AS</sub> y los ECT<sub>AS</sub> ( $p < 0,05$ , U de Mann-Whitney) que en este caso se podría asociar o bien a la presencia de gluten en la dieta o al estado de la mucosa intestinal.



**Figura 22.** Perfiles electroforéticos de DGGE con cebadores del grupo *Lactobacillus* a partir de muestras fecales de 11 individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>) (carriles del 1 al 11), 10 enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) (carriles del 12 al 21) y 11 enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (carriles del 22 al 32). Los números indican los fragmentos secuenciados, cuya identificación se muestra en la Tabla 13.

A partir del análisis de los perfiles electroforéticos mediante el coeficiente de Dice y el método UPGMA se obtuvo un dendograma en el que se formaron diferentes

clústers (Figura 23), pero no se observó un agrupamiento de las muestras asociado a la enfermedad ni a la dieta.



**Figura 23.** Dendrograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos de DGGE correspondientes al grupo *Lactobacillus* de individuos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>) empleando los cebadores Lac1 y Lac2GC basado en el índice de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA. Las letras en rojo indican los diferentes clústers formados.

Se seleccionaron varias bandas del gel para llevar a cabo la identificación molecular de las bacterias del grupo *Lactobacillus* que formaban parte de la microbiota fecal tanto de los individuos sanos como de los pacientes enfermos celíacos. Los productos de PCR que fueron identificados por secuenciación a partir de las bandas del DGGE aparecen en la Tabla 13. Para completar la identificación molecular de cada una de las bandas, también se llevó a cabo un análisis filogenético.

Bandas identificadas	Especie identificada	Identidad (%)
L18	<i>Lactobacillus amylovorus</i> (FR683089)	99
L31	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (HM683089)	99
L5, L12, L17, L37	<i>Lactobacillus gasseri</i> (JF720007)	99
L19	<i>Lactobacillus mucosae</i> (FR693800)	99
L15	<i>Lactobacillus paracasei</i> (HQ423165)	100
L39	<i>Lactobacillus reuteri</i> (GQ131183)	99
L11, L25	<i>Lactobacillus ruminis</i> (HQ022863)	99
L1, L9	<i>Lactobacillus sakei</i> (JF756332)	99
L3	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> (HM162420)	100
L6, L14, L24, L28, L32, L33, L35, L38, L40	<i>Leuconostoc citreum</i> (AB572028)	99
L27	<i>Leuconostoc sp.</i> (GU998855)	99
L2, L8, L13, L26, L29, L30, L34	<i>Weissella cibaria</i> (AB572037)	100

**Tabla 13.** Especies de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas identificadas a partir de la secuenciación de bandas de DGGE amplificadas de muestras fecales de individuos control y pacientes enfermos celíacos activos y tratados utilizando cebadores específicos para el grupo *Lactobacillus*. Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinado por la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

La frecuencia de las diferentes bacterias ácido lácticas detectadas mediante PCR-DGGE a partir de muestras fecales, aparece reflejada en la Tabla 14. Los fragmentos amplificados identificados como *Leuconostoc citreum* y *Weissella cibaria* aparecieron prácticamente en todos los individuos no celíacos y en los enfermos celíacos tanto activos como tratados. Por el contrario, la frecuencia de *Lactobacillus gasseri* y *L. paracasei* fue significativamente mayor en pacientes enfermos celíacos (independientemente de la dieta sin gluten) que en individuos no enfermos celíacos ( $p < 0,05$ , análisis chi cuadrado). También se encontraron diferencias significativas para *L. sakei* entre individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub> ( $p = 0,025$ ) y entre ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub> ( $p = 0,036$ ). La frecuencia de esta bacteria ácido láctica podría estar asociada a la presencia del gluten en la dieta. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a frecuencia de bacterias del grupo *Lactobacillus* entre individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub>.

Grupo bacteriano	No-EC <sub>A</sub> N=11(%)	ECA <sub>A</sub> N=10 (%)	ECT <sub>A</sub> N=11 (%)
<b>Bacterias ácido lácticas</b>			
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	0 (0)	1(10)	0(0)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1(9)	0(0)	1(9)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	3(27)	5(50)	3(27)
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0(0)	1(10)	0(0)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0(0)	2(20)	1(9)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0(0)	0(0)	1(9)
<i>Lactobacillus ruminis</i>	1(9)	1(10)	1(9)
<i>Lactobacillus sakei</i>	5(45)	4(40)	0(0)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	2(8)	0(0)	0(0)
<i>Leuconostoc citreum</i>	11(100)	10(100)	11(100)
<i>Leuconostoc sp.</i>	1(9)	0(0)	0(0)
<i>Weissella cibaria</i>	11(100)	9(90)	8(73)

**Tabla 14.** Frecuencia de especies de bacterias ácido lácticas detectadas mediante PCR-DGGE a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>) empleando cebadores específicos del grupo *Lactobacillus*.

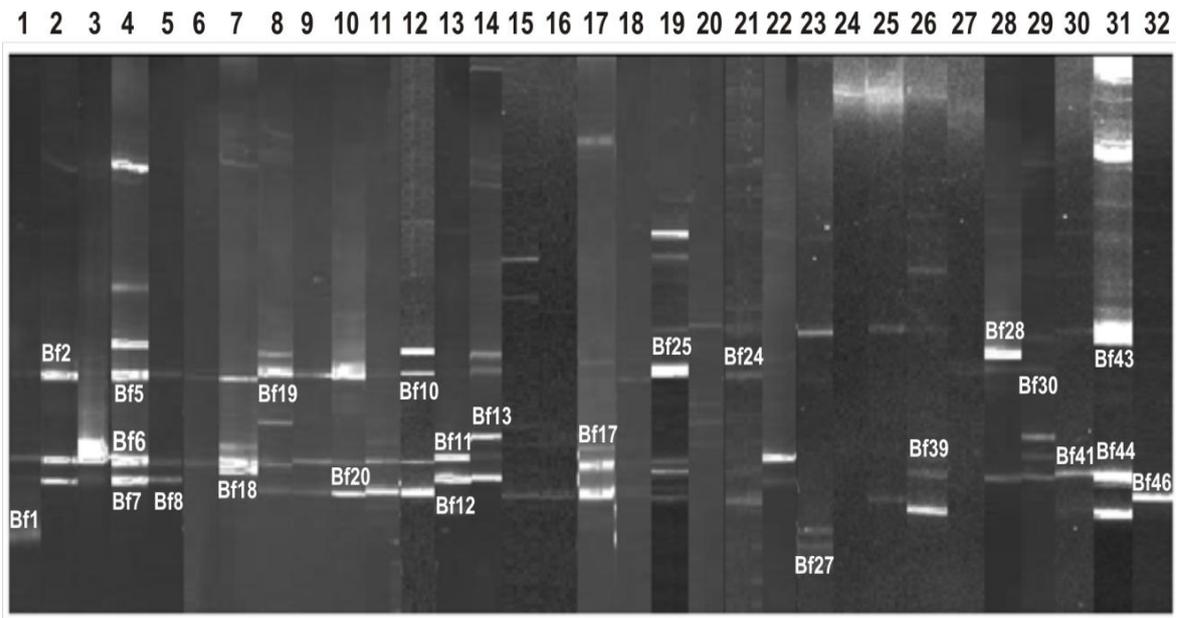
### 3.3. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo *Bifidobacterium*

Para el estudio de las comunidades de bacterias del género *Bifidobacterium* mediante PCR-DGGE se emplearon los cebadores g-Bifid F y g-Bifid R-GC (descritos en Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 24, en general los perfiles electroforéticos para las especies del género *Bifidobacterium* mostraron entre 1 a 5 bandas intensas y bien resueltas.

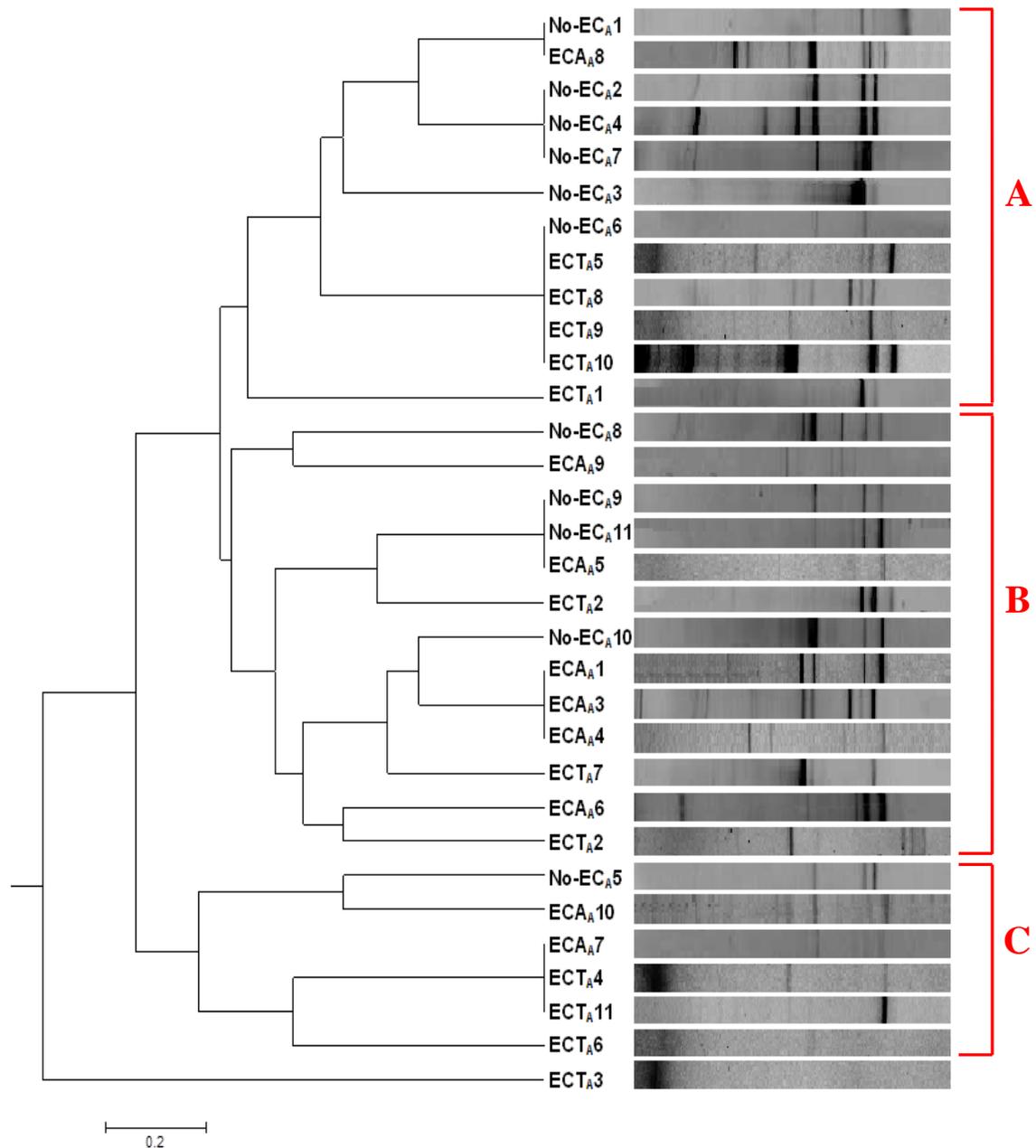
Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento (mediante el coeficiente de Dice y el método UPGMA) a partir de los diferentes perfiles de bandas de DGGE obtenidos para cada uno de los individuos no enfermos celiacos y de los enfermos celiacos (Figura 25). En el dendograma se observó la formación de 3 clústers diferentes. El primer clúster (A) agrupó 6 de los 11 individuos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>) y 5 de los 11 pacientes enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>), mientras que el segundo clúster (B) predominaron los pacientes enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>) (7/10), además de 4 individuos No-EC<sub>AS</sub> y 2 ECT<sub>AS</sub>. El tercer clúster (C) lo formaron 1 individuo No-EC<sub>A</sub>, 2 ECA<sub>AS</sub> y 3 ECT<sub>AS</sub>. La muestra fecal ECT<sub>A</sub> 3 fue la única que no se asoció a ninguno de los 3 clústers (Figura 25). Estos resultados determinaron que las comunidades de bacterias del género *Bifidobacterium* de los ECT<sub>AS</sub> se agruparon formando un clúster diferente del que forman las comunidades de *Bifidobacterium* de los ECA<sub>AS</sub>. Por el contrario, las

comunidades de bacterias del género *Bifidobacterium* de los individuos no enfermos celíacos aparecieron de forma dispersa entre ambos clústers.

Los análisis estadísticos determinaron que existían diferencias significativas asociadas a la enfermedad y a la dieta entre el perfil de bandas de los individuos No-EC<sub>AS</sub>, de los ECA<sub>AS</sub> y de los ECT<sub>AS</sub> ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis). Mediante la prueba U de Mann-Whitney, se determinó que las comunidades de bacterias del género *Bifidobacterium* asociadas a los ECT<sub>AS</sub> (número medio de bandas 1,9) fueron significativamente menos diversas que las comunidades de *Bifidobacterium* asociadas a individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub> (número medio de bandas 2,7 y 3,3 respectivamente) ( $p = 0,04$  y  $p = 0,02$  respectivamente). La dieta podría jugar un papel importante sobre la diversidad de bacterias del género *Bifidobacterium*.



**Figura 24.** Perfiles electroforéticos de DGGE con cebadores del grupo *Bifidobacterium* a partir de muestras fecales de 11 individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>) (carriles del 1 al 11), 10 enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) (carriles del 12 al 21) y 11 enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (carriles del 22 al 32). Los números indican los fragmentos secuenciados, cuya identificación se muestra en la Tabla 15.



**Figura 25.** Dendrograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos de DGGE del grupo *Bifidobacterium* a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) basado en el índice de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA. Las letras en rojo indican los distintos clústers formados.

Para completar el análisis del grupo *Bifidobacterium* mediante DGGE, se cortaron varias bandas de interés para la identificación de las bacterias. Los productos de PCR correspondientes al género *Bifidobacterium*, identificados mediante secuenciación se muestran en la Tabla 15. La frecuencia de las diferentes especies del género *Bifidobacterium* detectadas mediante PCR-DGGE a partir de muestras fecales de

individuos sanos y enfermos celíacos activos y tratados, aparece reflejado en la Tabla 16.

Bandas identificadas	Especie identificadas	Identidad (%)
Bf2, Bf5, Bf10, Bf13, Bf19, Bf24, Bf25, Bf30, Bf43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (HQ259739)	100
Bf 46	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (HQ293104)	99
Bf28	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (HQ259744)	100
Bf27	<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i> (AB491757)	100
Bf6, Bf11, Bf17, Bf39, Bf41, Bf44	<i>Bifidobacterium longum</i> (HQ 591348)	99
Bf1, Bf12, Bf20	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> (AB507091) o <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (NR037117)	100
Bf7, Bf8, Bf18	<i>Bifidobacteria</i> sp. (AB470316)	100

**Tabla 15.** Especies del género *Bifidobacterium* identificadas a partir de la secuenciación de bandas de DGGE amplificadas de muestras fecales de pacientes enfermos celíacos activos y tratados e individuos no enfermos celíacos empleando cebadores específicos para el grupo *Bifidobacterium*. Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinados en la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

*Bifidobacterium adolescentis* apareció prácticamente en todos los individuos no enfermos celíacos y en los enfermos celíacos activos y tratados. La presencia de *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. longum* y *B. catenulatum* o *B. pseudocatenulatum* fue significativamente mayor en pacientes enfermos celíacos que en individuos no enfermos celíacos ( $p < 0,05$ ). También se encontraron diferencias significativas para la presencia *B. bifidum* entre muestras fecales de individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub> ( $p = 0,04$ ) y para *Bifidobacterium* sp., que fue detectado más frecuentemente en individuos No-EC<sub>AS</sub> que en muestras fecales de ECT<sub>AS</sub> ( $p = 0,025$ ). La misma tendencia se observó para *B. pseudocatenulatum* o *B. catenulatum* que mostró una frecuencia mayor en ECA<sub>AS</sub> que en ECT<sub>AS</sub> ( $p = 0,04$ ).

Grupo bacteriano	No-EC <sub>A</sub> N=11(%)	ECA <sub>A</sub> N=10 (%)	ECT <sub>A</sub> N=11 (%)
<b>Bifidobacterias</b>			
<i>B. adolescentis</i>	8(73)	7(70)	9(82)
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	0(0)	2(20)	2(18)
<i>B. bifidum</i>	1(9)	6(60)	2(18)
<i>B. kashiwanohense</i>	0(0)	0(0)	1(9)
<i>B. longum</i>	11(100)	10(100)	5(45)
<i>B. catenulatum</i> o <i>B.pseudocatenulatum</i>	4(36)	8(80)	2(18)
<i>Bifidobacteria</i> sp.	5(45)	2(20)	0(0)

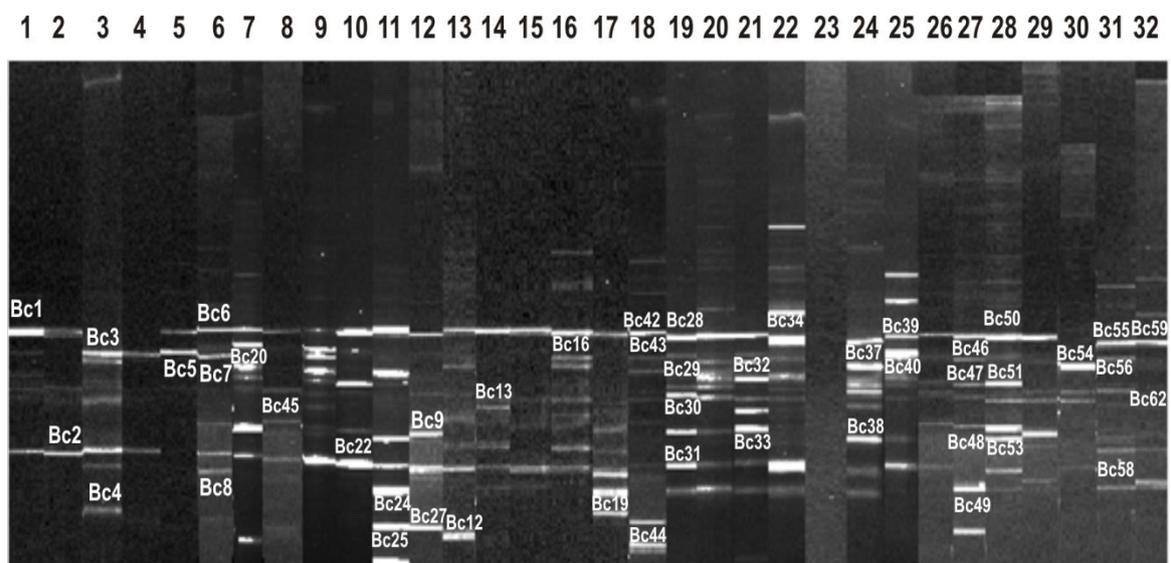
**Tabla 16.** Frecuencia de especies del género *Bifidobacterium* detectadas mediante PCR-DGGE a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) empleando cebadores específicos del grupo *Bifidobacterium*.

### 3.4. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo *Bacteroides*

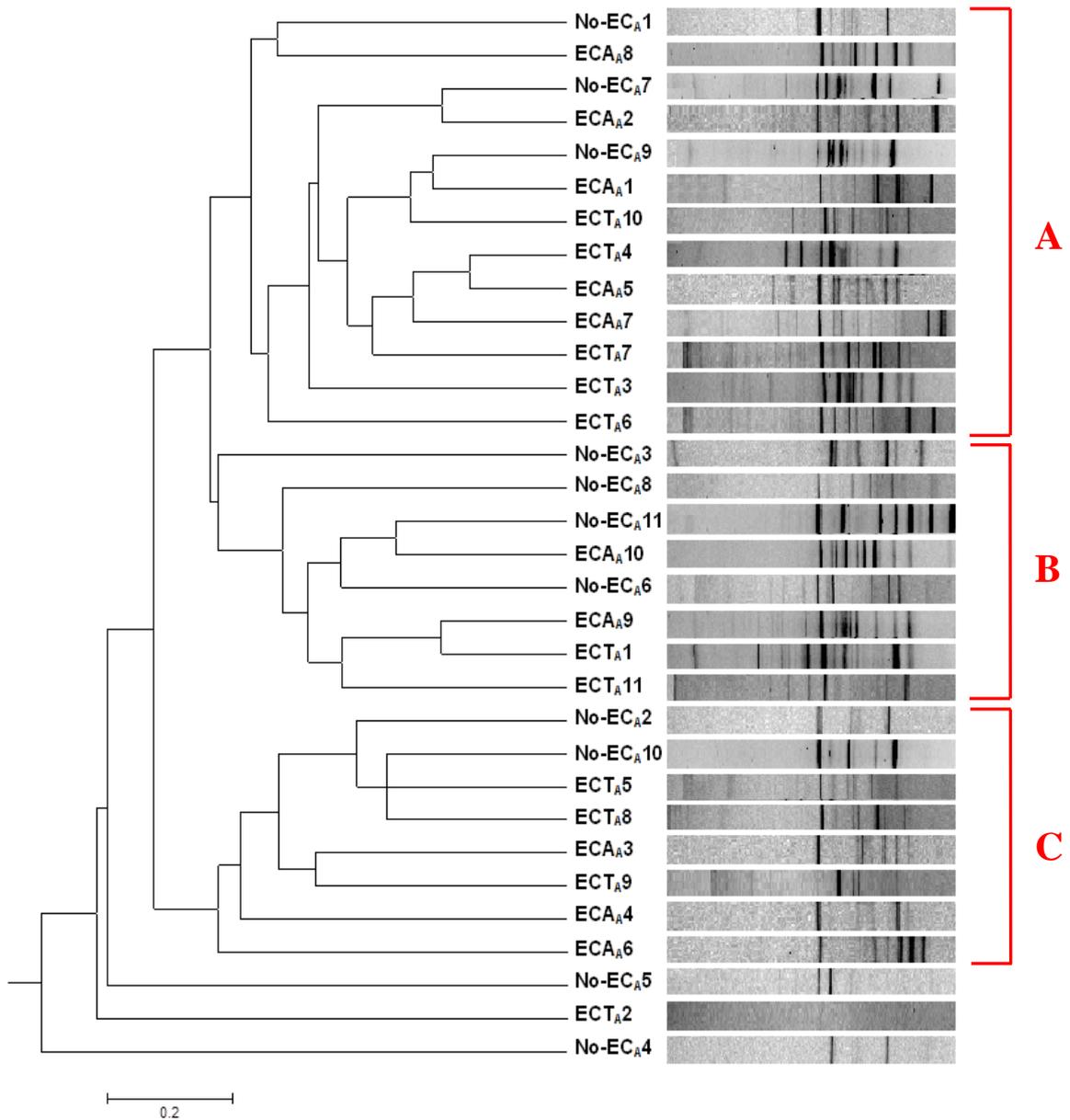
Se estudió también la presencia y diversidad (riqueza) de especies del género *Bacteroides* en muestras fecales de individuos control y enfermos celiacos mediante PCR-DGGE. Para ello se emplearon los cebadores Bfra531-f y Bfra766-r-GC, específicos para el género *Bacteroides* (descritos en Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 26, los perfiles electroforéticos presentaban entre 3 y 15 bandas intensas bien resueltas. Los diferentes perfiles de bandas de cada uno de los individuos, fueron agrupadas mediante el método UPGMA, basado en el coeficiente de Dice dando lugar a la formación de un dendograma (Figura 27). Se formaron 3 clústers claros y no se observó que ningún agrupamiento estuviera asociado a la enfermedad, ni a la dieta.

El número medio de bandas de los perfiles de DGGE fue mayor tanto en los enfermos celiacos activos (media 9,5) como en los enfermos celiacos tratados (media 10,4) en comparación con los individuos no enfermos celiacos, que presentaron una menor diversidad de bandas (media 8). Pero estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ; U de Mann-Whitney).



**Figura 26.** Perfiles electroforéticos de DGGE obtenidos con cebadores del grupo *Bacteroides* a partir de muestras fecales de 11 individuos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>) (carriles del 1 al 11), 10 enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>) (carriles del 12 al 21) y 11 enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (carriles del 22 al 32). Los números indican los fragmentos secuenciados, cuya identificación se muestra en la Tabla 17.



**Figura 27.** Dendrograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos de DGGE del grupo *Bacteroides* a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) basado en el índice de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA. Las letras en rojo indican los diferentes clústers formados.

Se seleccionaron varias bandas para llevar a cabo la identificación molecular de las bacterias correspondientes mediante secuenciación (Tabla 17). Esta identificación se completó mediante un análisis filogenético. La frecuencia de las diferentes especies del género *Bacteroides* detectadas mediante PCR-DGGE a partir de muestras fecales de individuos sanos y enfermos celíacos se muestra en la Tabla 18.

Bandas identificadas	Especie identificada	Identidad (%)
Bc13, Bc30	<i>Bacteroides fragilis</i> (AB618793)	100
Bc45	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (JF298875)	100
Bc47, Bc62	<i>Bacteroides finegoldii</i> (AB222700)	100
Bc32, Bc51	<i>Bacteroides ovatus</i> (DQ100446)	100
Bc33, Bc38, Bc48	<i>Bacteroides caccae</i> (NR026242)	100
Bc8, Bc24, Bc44, Bc49	<i>Bacteroides stercoris</i> (NR027196)	100
Bc2, Bc22, Bc31, Bc58	<i>Bacteroides uniformis</i> (JF298891)	100
Bc7, Bc37, Bc46	<i>Bacteroides massiliensis</i> (EU136696)	100
Bc3, Bc5, Bc20, Bc29, Bc40, Bc43, Bc54, Bc56	<i>Bacteroides dorei</i> (AB242143)	100
Bc1, Bc6, Bc16, Bc28, Bc34, Bc39, Bc42, Bc50, Bc55, Bc59	<i>Bacteroides vulgatus</i> (JF298873)	100
Bc9, Bc18, Bc53	<i>Bacteroides coprocola</i> (EU136688)	99
Bc4, Bc12, Bc25, Bc27	<i>Bacteroides plebeius</i> (AB200222)	99

**Tabla 17.** Especies del género *Bacteroides* identificadas a partir de la secuenciación de bandas de DGGE amplificadas de muestras fecales de pacientes enfermos celíacos activos y tratados e individuos no enfermos celíacos empleando cebadores específicos para el grupo *Bacteroides*. Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinado por la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

Dentro de las comunidades de bacterias identificadas del género *Bacteroides*, destacaron *B. uniformis*, *B. vulgatus* y *B. ovatus* ya que se detectaron prácticamente en todos los individuos control y enfermos celíacos. La frecuencia de las diferentes especies identificadas del género *Bacteroides* fueron significativamente más abundantes en muestras fecales de pacientes enfermos celíacos (independientemente del status de la enfermedad) que en individuos control ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a frecuencia entre individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECA<sub>AS</sub>, entre individuos No-EC<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub> y entre ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>.

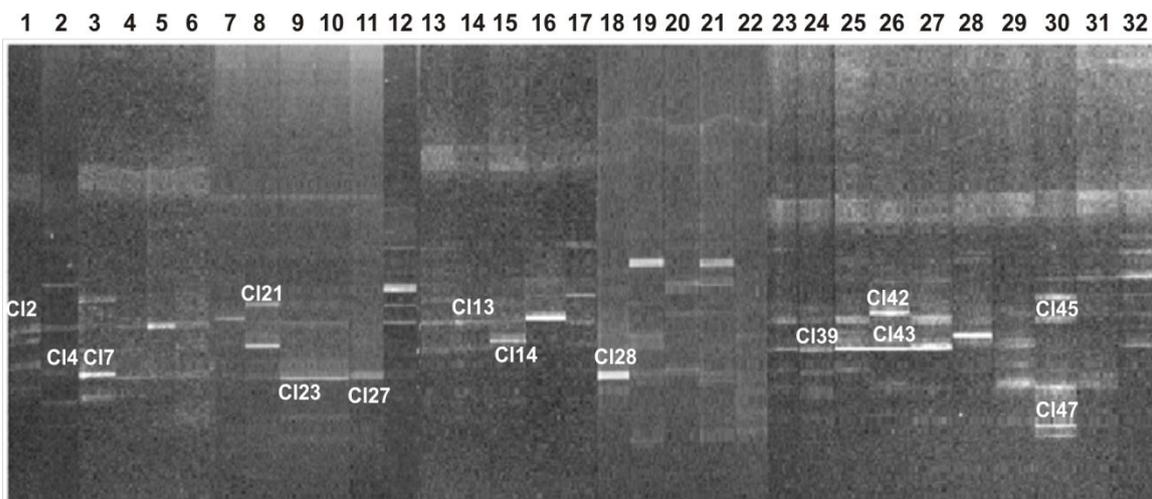
Grupo bacteriano	No-EC <sub>A</sub> N=11(%)	ECA <sub>A</sub> N=10 (%)	ECT <sub>A</sub> N=11 (%)
<b>Bacteroides</b>			
<i>B. fragilis</i>	1(9)	4(90)	3(27)
<i>B. thetaiotaomicron</i>	2(18)	5(50)	4(36)
<i>B. finegoldii</i>	2(18)	4(40)	3(27)
<i>B. ovatus</i>	7(64)	6(60)	8(73)
<i>B. caccae</i>	5(45)	8(80)	7(64)
<i>B. stercoris</i>	4(36)	6(60)	4(36)
<i>B. uniformis</i>	10(91)	10(100)	9(82)
<i>B. massiliensis</i>	4(36)	5(50)	2(18)
<i>B. dorei</i>	7(64)	5(50)	6(55)
<i>B. vulgatus</i>	9(82)	10(100)	10(91)
<i>B. coprocola</i>	3(27)	2(20)	4(36)
<i>B. plebeius</i>	4(36)	4(40)	2(18)

**Tabla 18.** Frecuencia de especies del género *Bacteroides* detectadas mediante PCR-DGGE a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) empleando cebadores específicos del grupo *Bacteroides*.

### 3.5. Análisis molecular de las comunidades de bacterias fecales con cebadores específicos del grupo *Clostridium*

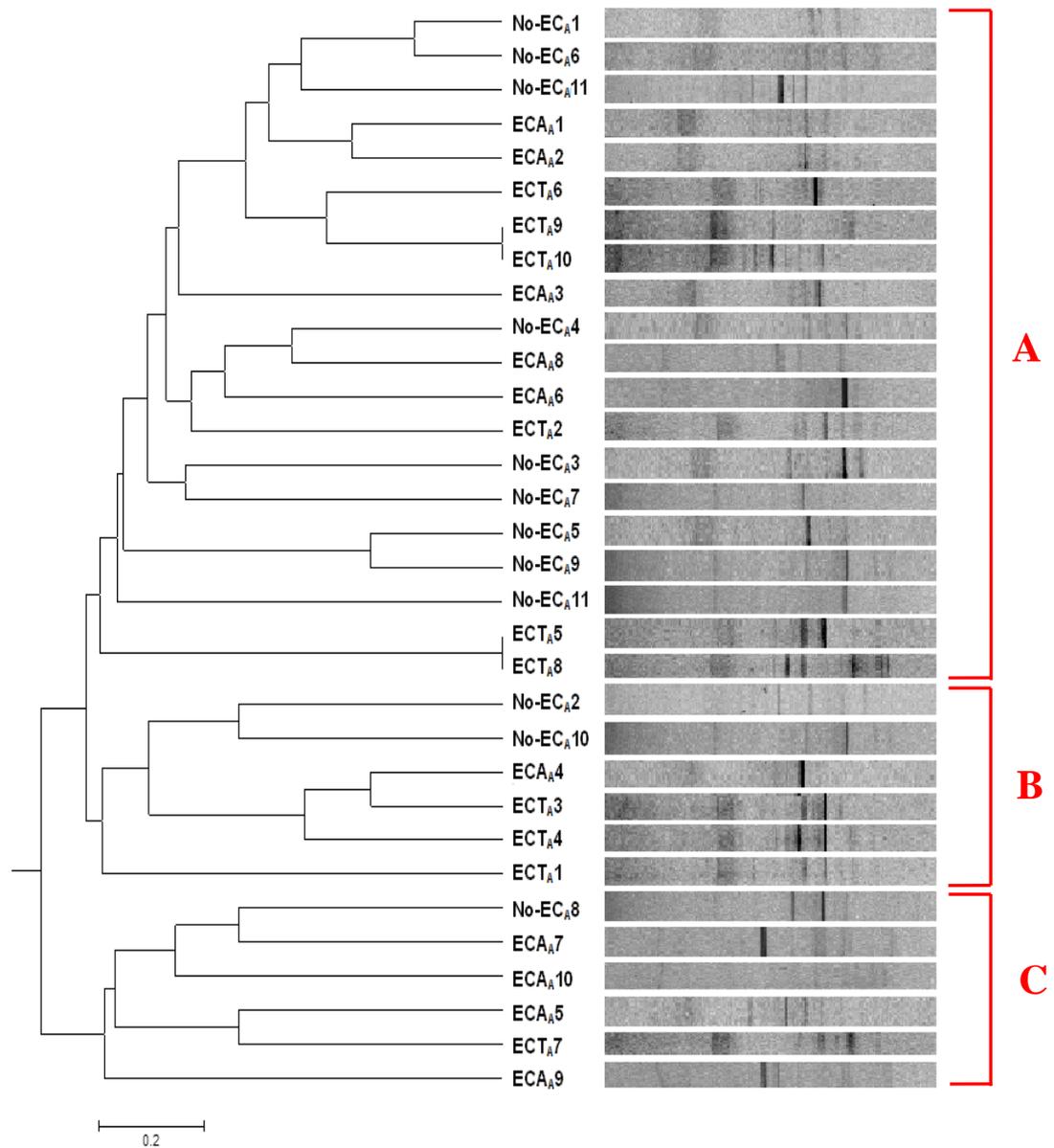
Por último, las muestras fecales también fueron analizadas mediante PCR-DGGE empleando los cebadores g-CcocF y g-CcocR, que son específicos para el grupo *Clostridium* (descritos en Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 28, la mayoría de los perfiles electroforéticos obtenidos fueron característicos para cada uno de los individuos analizados y presentaron entre 2 y 4 bandas más intensas, junto con otras bandas más tenues y peor resueltas.



**Figura 28.** Perfiles electroforéticos de DGGE obtenidos con cebadores del grupo *Clostridium* a partir de muestras fecales de 11 individuos no enfermos celiacos (No-EC<sub>A</sub>) (carriles del 1 al 11), 10 enfermos celiacos activos (ECA<sub>A</sub>) (carriles del 12 al 21) y 11 enfermos celiacos tratados (ECT<sub>A</sub>) (carriles del 22 al 32). Los números indican los fragmentos secuenciados, cuya identificación se muestra en la Tabla 19.

A partir del método UPGMA, mediante el coeficiente de Dice, se obtuvo un dendograma en el que se agrupaban las muestras fecales en 3 clústers diferentes. No se observó un agrupamiento claro de las muestras en base a las diferentes variables de estudio (Figura 29).



**Figura 29.** Dendograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos de DGGE del grupo *Clostridium* obtenidas a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) basado en el índice de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA.

Para completar el análisis del grupo *Clostridium* mediante DGGE, se seleccionaron varias bandas que fueron cortadas, purificadas y secuenciadas. En la Tabla 19 aparecen las bandas para las que se obtuvo la identificación a nivel de especie bacteriana.

Bandas identificadas	Especies identificadas	Identidad (%)
CI14, CI39, CI43	<i>Roseburia intestinalis</i> (HM007565)	99
CI23	<i>Eubacterium rectale</i> (AB626630)	100
CI4, CI7, CI27	<i>Roseburia faecis</i> (AY804150)	99
CI2, CI13, CI42	<i>Roseburia inulinivorans</i> (AJ270473)	100
CI21, CI45	<i>Ruminococcus torques</i> (NR036777)	98
CI47	<i>Ruminococcus gnavus</i> (GU723313)	100
CI28	<i>Butyrivibrio crossotus</i> (FR733670)	99

**Tabla 19:** Especies del grupo *Clostridium* identificadas a partir de la secuenciación de bandas de DGGE amplificadas de muestras fecales de pacientes enfermos celíacos activos y tratados e individuos control empleando cebadores específicos para el grupo *Clostridium*. Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinado por la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

Las frecuencias de detección de las diferentes especies del grupo *Clostridium* mediante PCR-DGGE se muestran en la Tabla 20. Los fragmentos amplificados correspondientes a *Roseburia inulinivorans* se detectaron en la mayoría de las muestras fecales tanto de individuos sanos como de enfermos celíacos activos y tratados. No se observaron diferencias significativas en cuanto a frecuencia de las diferentes especies identificadas entre individuos No-EC<sub>AS</sub>, ECA<sub>AS</sub> y ECT<sub>AS</sub>. Únicamente se observó que las bandas correspondientes a *Eubacterium rectale* sólo aparecían en los individuos No-EC<sub>AS</sub> (2/11) y por el contrario no se detectaron en ECA<sub>AS</sub> ni ECT<sub>AS</sub>, pero esta diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ).

Grupo bacteriano	No-EC <sub>A</sub> N=11(%)	ECA <sub>A</sub> N=10 (%)	ECT <sub>A</sub> N=11 (%)
<b>Clostridium</b>			
<i>Roseburia intestinalis</i>	1(9)	1(10)	3(27)
<i>Eubacterium rectale</i>	2(18)	0	0
<i>Roseburia faecis</i>	5(45)	4(40)	5(45)
<i>Roseburia inulinivorans</i>	7(64)	7(70)	7(64)
<i>Ruminococcus torques</i>	5(45)	3(30)	3(27)
<i>Ruminococcus gnavus</i>	2(18)	1(10)	1(9)
<i>Butyrivibrio crossotus</i>	1(9)	2(20)	1(9)

**Tabla 20.** Frecuencia de especies del grupo *Clostridium* detectadas mediante PCR-DGGE a partir de muestras fecales de individuos no enfermos celíacos (No-EC<sub>A</sub>), enfermos celíacos activos (ECA<sub>A</sub>) y enfermos celíacos tratados (ECT<sub>A</sub>) empleando cebadores específicos del grupo *Clostridium*.

### 3.6. Discusión

#### 3.6.1. Existe una microbiota fecal asociada a los individuos no enfermos celíacos

En este estudio se ha caracterizado por primera vez la microbiota fecal de individuos adultos enfermos celíacos tanto en estado activo como tratado en DSG, y a su vez se ha comparado con la microbiota fecal de individuos no enfermos celíacos mediante PCR-DGGE. Las muestras fecales de cada uno de los individuos analizados mostraron un perfil de DGGE único al emplear los primers que amplifican la región V3 del ADN<sub>r</sub> 16S. Al igual que ocurría cuando se ha llevado a cabo la PCR-DGGE a partir de muestras fecales de niños sanos y enfermos celíacos (Di Cagno *et al.*, 2009), no existe un perfil de bandas que inequívocamente se pueda asociar a la enfermedad celíaca. Di Cagno *et al.* (2009), tampoco observaron un cambio importante en la estructura de la microbiota fecal de niños con enfermedad celíaca en comparación a los sanos. Sin embargo, en los adultos sí que se observó la presencia de una microbiota fecal asociada a los individuos sanos, sugiriendo que los pacientes enfermos celíacos presentan cambios en su microbiota en comparación a los No-EC<sub>AS</sub> como consecuencia de la enfermedad. El perfil de bandas de DGGE de gran parte de los ECT<sub>AS</sub> (6 de los 11 individuos ECT<sub>AS</sub> analizados) tras el mantenimiento de una dieta libre de gluten se encuentran formando parte del clúster representado por los individuos No-EC<sub>AS</sub>. Esto podría indicar una posible asociación entre el estado de inflamación de la mucosa intestinal y el tipo de colonización de la microbiota.

La diversidad de la microbiota fecal, en función del número de bandas de los perfiles de DGGE fue mayor en los adultos sanos que en los enfermos celíacos, pero estas diferencias no fueron significativas. Este mismo efecto se ha encontrado en pacientes con colitis ulcerosa, en los que se observó mediante electroforesis en gradiente temporal de temperatura una menor diversidad de bacterias fecales en comparación a los sanos (Sokol *et al.*, 2006b). Manichanh *et al.* (2006), mediante una aproximación metagenómica determinaron también una reducción en la diversidad de bacterias del filo *Firmicutes* en muestras fecales de pacientes con enfermedad de Crohn. Sin embargo, en los niños se ha observado el efecto contrario, varios estudios han mostrado una diversidad de bacterias significativamente mayor en los enfermos celíacos que en los individuos control (Sanz *et al.*, 2007a; Schippa *et al.*, 2010).

Hay que tener en cuenta que los cebadores universales son demasiado genéricos y podrían no detectar cambios que ocurrán en respuesta a la patología de la enfermedad celiaca, por ello es necesario llevar a cabo más estudios. Teniendo en cuenta esta hipótesis, la diversidad bacteriana fue también estudiada a nivel de varios grupos importantes en el intestino. Los grupos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium* han sido detectados en muestras fecales humanas tanto en individuos sanos como en pacientes enfermos celiacos, mediante PCR-DGGE empleando cebadores específicos de grupo (Sanz *et al.*, 2007a; Di Cagno *et al.*, 2009), mediante PCR a tiempo real (Collado *et al.*, 2008) o por hibridación *in situ* fluorescente (Collado *et al.*, 2007).

### **3.6.2. La diversidad de bacterias del grupo *Lactobacillus* se ve afectada por la dieta**

Aunque las bacterias ácido lácticas que aparecen en el intestino son muy dependientes de la dieta, estas especies fueron también analizadas porque forman parte de la microbiota del intestino y son interesantes debido a su posible papel como probióticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Sanz *et al.*, 2007b; Sánchez *et al.*, 2010). Nuestros resultados reflejaron que los individuos No-EC<sub>AS</sub> y los ECA<sub>AS</sub> presentaron una diversidad de bacterias del grupo *Lactobacillus* significativamente mayor que los ECT<sub>AS</sub>, sugiriendo que esta reducción podría ser debida al mantenimiento de una dieta libre de gluten más que por la propia enfermedad. La frecuencia de *Lactobacillus gasseri* y *L. paracasei* fue significativamente mayor en los pacientes enfermos celiacos en comparación con los individuos No-EC<sub>AS</sub>. Mientras que la frecuencia de *L. sakei* se vio afectada por la presencia del gluten en la dieta, ya que no se detectó en ninguno de los ECT<sub>AS</sub> analizados. *L. sakei* se aísla frecuentemente de productos cárnicos fermentados, y se ha descrito que presenta actividad proteolítica. Concretamente se ha caracterizado una X-prolil-dipeptidil proteasa que participa durante el proceso de fermentación de la carne, actuando sobre los compuestos responsables del aroma y dando lugar a la liberación de aminoácidos que son necesarios para su propio crecimiento (Sanz & Toldra, 2001). Los productos cárnicos fermentados son limitados en la dieta de los pacientes ECT, quizás por este motivo se observa una reducción en la detección de esta especie. La proporción de las diferentes especies del grupo *Lactobacillus* podría ser funcionalmente importante, ya que éstas influyen en la bioquímica, inmunología y dinámica poblacional del tracto intestinal del huésped

(Walter *et al.*, 2000; Reuter, 2001). Alteraciones en la composición de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas han sido descritas tanto en pacientes con enfermedad de Crohn como en pacientes con colitis ulcerosa (Bullock *et al.*, 2004; Scanlan *et al.*, 2006).

### **3.6.3. Las comunidades de bacterias del grupo *Bifidobacterium* son significativamente menos diversas en los pacientes enfermos celíacos tratados**

*Bifidobacterium* es el tercer género más frecuente de la microbiota intestinal humana después de *Bacteroides* y *Eubacterium* (Finegold *et al.*, 1983a). Al igual que ocurría con los lactobacilos, nuestros resultados determinaron que las comunidades de bacterias asociadas a los ECT<sub>AS</sub> son significativamente menos diversas que las de los No-EC<sub>AS</sub> y los ECA<sub>AS</sub>. De nuevo la dieta parece tener un papel importante en los adultos sobre la diversidad de bacterias del género *Bifidobacterium*. Al contrario de lo que ocurre en los niños enfermos celíacos, donde los niveles de *Bifidobacterium* fueron significativamente más bajos que en los niños control (Sanz *et al.*, 2007a; Collado *et al.*, 2008). Esta misma tendencia también se observó en la mucosa de pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales en comparación a los individuos sanos (Macfarlane *et al.*, 2005; Mylonaki *et al.*, 2005). A partir del dendograma, no se observó una estructura clara de las comunidades de *Bifidobacterium* de los individuos sanos, ya que en algunos casos fueron similares a las comunidades de bacterias de los ECA<sub>AS</sub>, mientras que en otros casos formaron parte del clúster de los ECT<sub>A</sub>. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Di Cagno *et al.* (2009), a partir de muestras fecales de niños sanos y enfermos celíacos activos y tratados.

En nuestro estudio, la frecuencia de *B. bifidum* y *B. pseudocatenulatum* o *B. catenulatum* fue mayor en los ECA<sub>AS</sub> que en los ECT<sub>AS</sub> y en los individuos No-EC<sub>AS</sub>. Estas especies parecen estar asociadas a la fase activa de la enfermedad. Mientras que la detección de *B. longum* se vio afectada por la presencia del gluten en la dieta, mostrando una reducción en la frecuencia de este microorganismo en los ECT<sub>AS</sub>. También en este estudio se observó que *B. animalis* subsp. *lactis* sólo aparecía en los pacientes enfermos celíacos tanto activos como tratados, aunque con una frecuencia más baja. Dentro de la microbiota de los niños, se ha sugerido que la frecuencia de determinadas especies de *Bifidobacterium* podría estar asociada a la aparición de

enfermedades atópicas (Young *et al.*, 2004). Además se ha demostrado que diferentes cepas de *Bifidobacterium* presentan propiedades anti-inflamatorias (Medina *et al.*, 2008), por lo que se han empleado como probióticos, o para tratar o prevenir situaciones de inflamación crónica como por ejemplo en las enfermedades inflamatorias intestinales (Sanz *et al.*, 2007b). Sin embargo, en función de los resultados obtenidos en los adultos, no se ha encontrado una asociación entre la frecuencia de las diferentes especies de *Bifidobacterium* y la enfermedad celiaca.

#### **3.6.4. Existe una diversidad mayor de bacterias del género *Bacteroides* en muestras fecales de pacientes enfermos celíacos**

El género *Bacteroides* es considerado como uno de los grupos bacterianos más abundantes del colon humano, representan aproximadamente el 30% de todas las bacterias cultivables fecales, la mayoría de las cuales pertenecen al clúster *Bacteroides fragilis* (Dore *et al.*, 1998). Nuestros resultados mostraron una diversidad mayor de *Bacteroides* en las muestras fecales de pacientes adultos enfermos celíacos (tanto activos como tratados) con respecto a los individuos no enfermos celíacos, aunque estas diferencias no fueron significativas. No ocurre lo mismo en biopsias duodenales de niños enfermos celíacos, donde se ha detectado una diversidad menor de *Bacteroides* que en los niños control (Sánchez *et al.*, 2010). Se ha descrito que determinadas especies del género *Bacteroides* presentan una patogenicidad potencial, asociada a una variedad de factores de virulencia (Botta *et al.*, 1994). Por este motivo, resulta interesante desde un punto de vista epidemiológico la identificación de las especies del género *Bacteroides* asociadas a una determinada enfermedad. Las muestras fecales de pacientes con enfermedad de Crohn se han caracterizado por presentar una abundancia relativa menor de *Bacteroides uniformis* y por el contrario una frecuencia mayor de *B. ovatus* y *B. vulgatus* (Dicksved *et al.*, 2008). Varios trabajos han sugerido que *B. ovatus* y *B. vulgatus* podrían alterar la integridad de la barrera epitelial intestinal y además contribuir a la iniciación de la respuesta inflamatoria que tiene lugar en las enfermedades inflamatorias intestinales (Saitoh *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2003). Por el contrario, Noor *et al.* (2010), determinaron una reducción en el número de especies del género *Bacteroides* en pacientes con colitis ulcerosa, fundamentalmente de *B. vulgatus* y *B. ovatus*. En contradicción a los trabajos anteriores, se ha asociado esta reducción en el número de *Bacteroides* con la pérdida de un posible papel protector frente a la enfermedad por parte de este grupo de bacterias. En biopsias duodenales de niños

enfermos celíacos se observó un incremento en la frecuencia de *B. dorei* y un descenso en la abundancia de *B. ovatus* y *B. uniformis* (Sánchez *et al.*, 2010). En base a nuestros resultados, dentro de las comunidades de bacterias identificadas del género *Bacteroides*, destacaron *B. uniformis*, *B. vulgatus* y *B. ovatus* que aparecieron prácticamente en todos los individuos adultos tanto sanos como enfermos. En general, la frecuencia de las diferentes bacterias identificadas del género *Bacteroides* fue más abundante en los pacientes enfermos celíacos que en los individuos control.

### **3.6.5. No se han encontrado diferencias significativas entre individuos sanos y enfermos celíacos con respecto a las especies del grupo *Clostridium***

Los perfiles de bandas de DGGE de las comunidades de bacterias del grupo *Clostridium* no mostraron diferencias significativas entre la microbiota fecal de pacientes enfermos celíacos y la microbiota fecal de individuos no celíacos. El tracto intestinal es un ecosistema muy diverso y mediante el DGGE sólo se detectan las especies bacterianas predominantes, por este motivo en algunos casos la estructura de las comunidades microbianas podría estar subestimada. Además, esto se une a la propia variabilidad que presenta cada paciente, lo que podría enmascarar los cambios que tienen lugar en respuesta a la enfermedad o al mantenimiento de una dieta libre de gluten (Di Cagno *et al.*, 2009).

En los individuos adultos, las especies del grupo *Clostridium* detectadas con una frecuencia mayor fueron *Roseburia faecis*, *Roseburia inulinovorans* y *Ruminococcus torques*. Con una frecuencia menor aparecieron *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus gnavus* y *Butyrivibrio crossotus*, pero no se observaron diferencias significativas entre individuos sanos y enfermos celíacos tanto activos como tratados. Tampoco Di Cagno *et al.*, (2009) encontraron diferencias dentro del grupo *Clostridium* entre niños sanos y enfermos celíacos mediante DGGE. En otros trabajos sí que se han descrito cambios, como por ejemplo miembros del grupo *Clostridium leptum* fueron significativamente más abundantes en muestras fecales de niños enfermos celíacos que en niños sanos (Collado *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2008). Un estudio reciente de De Palma *et al.* (2010), determinó que los grupos correspondientes a *Clostridium histolyticum*, *C. lituseburense* y *Faecalibacterium prausnitzii* aparecían por el contrario en mayor proporción en los niños sanos que en los pacientes enfermos celíacos. Los grupos *C. coccoides* y *C. leptum* aparecieron reducidos en muestras

fecales tanto de pacientes con enfermedad de Crohn como en pacientes con colitis ulcerosa (Takaishi *et al.*, 2008). El grupo *Clostridium leptum* contiene bacterias productoras de butirato, como por ejemplo *Faecalibacterium prausnitzii*. El butirato es una fuente de energía importante para los colonocitos y tiene efectos anti-inflamatorios (Gophna *et al.*, 2006). Se ha demostrado que una disminución de *F. prausnitzii*, junto con otras bacterias productoras de butirato puede ocasionar inflamación intestinal en individuos genéticamente susceptibles (Li *et al.*, 2008). Willing *et al.*, (2010) determinaron de nuevo que los pacientes con enfermedad de Crohn localizada en el íleon, presentaban una reducción en el número de bacterias de *Faecalibacterium* y *Roseburia*, frente a un aumento en la proporción de *E. coli* y *Ruminococcus gnavus*. Aunque algunos estudios muestran resultados contradictorios, parece ser que la presencia de ciertos grupos de *Clostridium* y *F. prausnitzii* es deficiente en la microbiota de pacientes con enfermedad de Crohn y probablemente también se produzca este mismo efecto en los pacientes con enfermedad celiaca, aunque se necesita llevar a cabo más estudios (De Palma *et al.*, 2010).

# **CONCLUSIONES**

---

---



1. Los resultados obtenidos a partir del estudio de la microbiota duodenal de individuos sanos y enfermos celíacos mediante colección de clones no muestran diferencias claras asociadas al diagnóstico de la enfermedad celíaca.
2. El tratamiento de la EC mediante la retirada del gluten de la dieta, ocasiona cambios en la composición de la microbiota del intestino delgado de los pacientes adultos enfermos celíacos tratados.
3. La edad es uno de los factores que determina las diferencias entre las comunidades de bacterias de los niños y los adultos, tanto entre individuos no celíacos como entre pacientes diagnosticados de EC.
4. La microbiota duodenal capaz de crecer en el medio MCB está dominada por especies del género *Streptococcus*.
5. El DGGE muestra una microbiota fecal asociada a los individuos sanos sugiriendo que los pacientes enfermos celíacos podrían presentar cambios en su microbiota fecal como consecuencia de la enfermedad.
6. Los pacientes enfermos celíacos tratados mostraron una reducción en la diversidad de bacterias fecales del grupo *Lactobacillus* y del grupo *Bifidobacterium* frente a los individuos celíacos activos y sanos.
7. No hemos encontrado una relación definida entre las diferentes especies del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Clostridium* con la enfermedad celíaca.



# **BIBLIOGRAFÍA**

---

---



- Alaedini, A. & Green, P.H. (2005).** Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med*, **142**, 289-298.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Amann, R.I. (1995).** In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, pp. 1-15. En: *Molecular microbial ecology manual*. (A. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas, y F. J. De Bruijn, eds.) Kluwer Academic Publishers, vol. 3.3.6. Dordrecht.
- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, **59**, 143-169.
- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Backhed, F., Nyren, P. & Engstrand, L. (2008).** Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*, **3**, e2836. doi: 10.1371/journal.pone.0002836.
- Andoh, A., Sakata, S., Koizumi, Y., Mitsuyama, K., Fujiyama, Y. & Benno, Y. (2007).** Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, **13**, 955-962.
- Antunes, L.C. & Finlay, B.B. (2011).** A comparative analysis of the effect of antibiotic treatment and enteric infection on intestinal homeostasis. *Gut Microbes*, **2**, 105-108.
- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M. & McAdam, S.N. (2000).** The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med*, **191**, 603-612.
- Arranz, E. & Garrote, J.A. (2009).** Inmunología de la enfermedad celíaca. *Gastroenterol Hepatol*. doi:10.1016/j.gastrohep.2009.11.003.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Dore, J., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'Rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sánchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. & Bork, P. (2011).** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 174-180.
- Babron, M.C., Nilsson, S., Adamovic, S., Naluai, A.T., Wahlstrom, J., Ascher, H., Ciclitira, P.J., Sollid, L.M., Partanen, J., Greco, L. & Clerget-Darpoux, F. (2003).** Meta and pooled analysis of European coeliac disease data. *Eur J Hum Genet*, **11**, 828-834.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A. & Gordon, J.I. (2005).** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, **307**, 1915-1920.

- Baev, P.V. & Penev, L.D. (1995).** BIODIV: program for calculating biological diversity parameters similarity, niche overlap, and cluster analysis. Version 5.1. Pensoft, Sofía-Moscú, Rusia, 57 pp.
- Barcenilla, A., Pryde, S.E., Martin, J.C., Duncan, S.H., Stewart, C.S., Henderson, C. & Flint, H.J. (2000).** Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1654-1661.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E. & Simpson, K.W. (2007).** Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J*, **1**, 403-418.
- Bernardo, D., Garrote, J.A., Nadal, I., León, A.J., Calvo, C., Fernández-Salazar, L., Blanco-Quirós, A., Sanz, Y. & Arranz, E. (2009).** Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa. *Gut*, **58**, 886-887.
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A. & Welling, G.W. (2011).** Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, **8**. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.009.
- Biagi, E., Candela, M., Fairweather-Tait, S., Franceschi, C. & Brigidi, P. (2011).** Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age (Dordr)*. doi: 10.1007/s11357-011-9217-5
- Bibiloni, R., Mangold, M., Madsen, K.L., Fedorak, R.N. & Tannock, G.W. (2006).** The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol*, **55**, 1141-1149.
- Bik, E.M., Eckburg, P.B., Gill, S.R., Nelson, K.E., Purdom, E.A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M.J. & Relman, D.A. (2006).** Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 732-737.
- Bjorksten, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T. & Mikelsaar, M. (2001).** Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*, **108**, 516-520.
- Børresen, A.L., Hovig, E., Brøgger, A. (1988).** Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes. *Mutat Res*, **202**, 77-83.
- Botta, G.A., Arzese, A., Minisini, R. & Trani, G. (1994).** Role of structural and extracellular virulence factors in gram-negative anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis*, **18 Suppl 4**, S260-264.
- Briani, C., Samaroo, D. & Alaedini, A. (2008).** Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev*, **7**, 644-650.
- Brown, M.V. & Bowman, J.P. (2001).** A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol Ecol*, **35**, 267-275.
- Brunser, O., Figueroa, G., Gotteland, M., Haschke-Becher, E., Magliola, C., Rochat, F., Cruchet, S., Palframan, R., Gibson, G., Chauffard, F. & Haschke, F. (2006).** Effects of probiotic or prebiotic supplemented milk formulas on fecal microbiota composition of infants. *Asia Pac J Clin Nutr*, **15**, 368-376.

- Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R. & Hermon-Taylor, J. (2003).** Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol*, **41**, 2915-2923.
- Bullock, N.R., Booth, J.C. & Gibson, G.R. (2004).** Comparative composition of bacteria in the human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol*, **5**, 59-64.
- Butler, J.E., Sun, J., Weber, P., Navarro, P. & Francis, D. (2000).** Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology*, **100**, 119-130.
- Caminero, A., Nistal, E., Arias, L., Vivas, S., Comino, I., Real, A., Sousa, C., de Morales, J.M., Ferrero, M.A., Rodriguez-Aparicio, L.B. & Casqueiro, J. (2011).** A gluten metabolism study in healthy individuals shows the presence of faecal glutenase activity. *Eur J Nutr*. doi: 10.1007/s00394-011-0214-3.
- Challacombe, D.N., Richardson, J.M., Rowe, B. & Anderson, C.M. (1974).** Bacterial microflora of the upper gastrointestinal tract in infants with protracted diarrhoea. *Arch Dis Child*, **49**, 270-277.
- Chand, N. & Mihas, A.A. (2006).** Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol*, **40**, 3-14.
- Chapman, M.A., Grahn, M.F., Boyle, M.A., Hutton, M., Rogers, J. & Williams, N.S. (1994).** Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut*, **35**, 73-76.
- Chow, J., Lee, S.M., Shen, Y., Khosravi, A. & Mazmanian, S.K. (2010).** Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*, **107**, 243-274.
- Ciclitira, P.J., King, A.L. & Fraser, J.S. (2001).** AGA technical review on Celiac Sprue. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*, **120**, 1526-1540.
- Ciortescu, I. & Stan, M. (2010).** [*Helicobacter pylori*--friend or foe?]. *Rev Med Chir Soc*, **114**, 619-24.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. & Comi, G. (2001).** Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 5113-5121.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M. & Tiedje, J.M. (2007).** The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res*, **35**, D169-172.
- Collado, M.C., Calabuig, M. & Sanz, Y. (2007).** Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol*, **8**, 9-14.
- Collado, M.C., Delgado, S., Maldonado, A. & Rodriguez, J.M. (2009a).** Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letts Appl Microbiol*, **48**, 523-528.

- Collado, M.C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. (2008).** Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol*, **8**, 232.
- Collado, M.C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. (2009b).** Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol*, **62**, 264-269.
- Collin, P., Kaukinen, K. & Maki, M. (1999).** Clinical features of celiac disease today. *Dig Dis*, **17**, 100-106.
- Conte, M.P., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L., Osborn, J., Falconieri, P., Borrelli, O. & Cucchiara, S. (2006).** Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, **55**, 1760-1767.
- Conway, P.L. (1995).** Microbial ecology of the human large intestine. Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition Physiology, and Pathology. G.R. Gibson, G.T. MacFarlane (eds), CRC Press, Boca Ratón pp. 1-24.
- Cosseau, C., Devine, D.A., Dullaghan, E., Gardy, J.L., Chikatamarla, A., Gellatly, S., Yu, L.L., Pistolic, J., Falsafi, R., Tagg, J. & Hancock, R.E. (2008).** The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun*, **76**, 4163-4175.
- da Silva Neves, M.M., Gonzalez-Garcia, M.B., Nouws, H.P., Delerue-Matos, C., Santos-Silva, A. & Costa-Garcia, A. (2010).** Celiac disease diagnosis and gluten-free food analytical control. *Anal Bioanal Chem*, **397**, 1743-1753.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., Bringer, M.A., Swidsinski, A., Beaugerie, L. & Colombel, J.F. (2004).** High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, **127**, 412-421.
- De Angelis, M., Rizzello, C.G., Fasano, A., Clemente, M.G., De Simone, C., Silano, M., De Vincenzi, M., Losito, I. & Gobbetti, M. (2006).** VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *Biochim Biophys Acta*, **1762**, 80-93.
- De Palma, G., Nadal, I., Collado, M.C. & Sanz, Y. (2009).** Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr*, **102**, 1154-1160.
- De Palma, G., Nadal, I., Medina, M., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. (2010).** Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol*, **10**, 63.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S.D. & Renault, P. (2010).** Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl Environ Microbiol*, **76**, 451-460.
- Dethlefsen, L., Eckburg, P.B., Bik, E.M. & Relman, D.A. (2006).** Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol*, **21**, 517-523.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M. & Gobbetti, M. (2002).** Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 623-633.

- Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Gagliardi, F., Ricciuti, P., Ndagijimana, M., Francavilla, R., Guerzoni, M.E., Crecchio, C., Gobetti, M. & De Angelis, M. (2009).** Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 3963-3971.
- Dianda, L., Hanby, A.M., Wright, N.A., Sebesteny, A., Hayday, A.C. & Owen, M.J. (1997).** T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol*, **150**, 91-97.
- Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., Jarnerot, G., Tysk, C., Apajalahti, J., Engstrand, L. & Jansson, J.K. (2008).** Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *Isme J*, **2**, 716-727.
- Dicksved, J., Lindberg, M., Rosenquist, M., Enroth, H., Jansson, J.K. & Engstrand, L. (2009).** Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *J Med Microbiol*, **58**, 509-516.
- Dinoto, A., Suksomcheep, A., Ishizuka, S., Kimura, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Asano, K., Tomita, F. & Yokota, A. (2006).** Modulation of rat cecal microbiota by administration of raffinose and encapsulated *Bifidobacterium breve*. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 784-792.
- Donskey, C.J., Hujer, A.M., Das, S.M., Pultz, N.J., Bonomo, R.A. & Rice, L.B. (2003).** Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J Microbiol Methods*, **54**, 249-256.
- Dore, J., Sghir, A., Hannequart-Gramet, G., Corthier, G. & Pochart, P. (1998).** Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal *Bacteroides* populations. *Syst Appl Microbiol*, **21**, 65-71.
- Dorer, M.S., Talarico, S. & Salama, N.R. (2009).** *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog*, **5**, e1000544. doi: 10.1371/journal.ppat.1000544.
- Ducluzeau, R. (1993).** [Development, equilibrium and role of microbial flora in the newborn]. *Ann Pediatr (Paris)*, **40**, 13-22.
- Dumonceaux, T.J., Hill, J.E., Hemmingsen, S.M. & Van Kessel, A.G. (2006).** Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 2815-2823.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. (2005).** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635-1638.
- Enck, P., Zimmermann, K., Rusch, K., Schwiertz, A., Klosterhalfen, S. & Frick, J.S. (2009).** The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults. *Z Gastroenterol*, **47**, 653-658.
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. & Streit, W.R. (2001).** Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 89-99.
- Espinosa, E. (2003).** ¿Cuántas especies hay?. Los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos: ciencia y cultura*, **52**, 53-56.

- Fairchild, A.S., Smith, J.L., Idris, U., Lu, J., Sánchez, S., Purvis, L.B., Hofacre, C. & Lee, M.D. (2005).** Effects of orally administered tetracycline on the intestinal community structure of chickens and on tet determinant carriage by commensal bacteria and *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 5865-5872.
- Fallani, M., Rigottier-Gois, L., Aguilera, M., Bridonneau, C., Collignon, A., Edwards, C.A., Corthier, G. & Doré, J. (2006).** Clostridium difficile and Clostridium perfringens species detected in infant faecal microbiota using 16S rRNA targeted probes. *J Microbiol Methods*, **67**, 150-161.
- Favier, C., Neut, C., Mizon, C., Cortot, A., Colombel, J.F. & Mizon, J. (1997).** Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, **42**, 817-822.
- Favier, C.F., Vaughan, E.E., De Vos, W.M. & Akkermans, A.D. (2002).** Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 219-226.
- Ferguson, A., Arranz, E. & O'Mahony, S. (1993).** Clinical and pathological spectrum of coeliac disease--active, silent, latent, potential. *Gut*, **34**, 150-151.
- Finegold, S.M., Attebery, H.R. & Sutter, V.L. (1974).** Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr*, **27**, 1456-1469.
- Finegold, S.M., Mathisen, G.E. & George, W.L. (1983b).** Changes in human intestinal flora related to the administration of antimicrobial agents. En: *Human intestinal microflora in health and disease*. Hentges D.J., ed. New York: Academic Press, pp. 356-446.
- Finegold, S.M., Sutter, V.L. & Mathisen, G.E. (1983a).** Normal indigenous intestinal flora. En: *Human intestinal microflora in health and disease*. Hentges, D.J., Ed. Academic Press, New York. pp. 3-31
- Fischer, S.G. & Lerman, L.S. (1979).** Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, **16**, 191-200.
- Fischer, S.G. & Lerman, L.S. (1983).** DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 1579-1583.
- Forsberg, G., Fahlgren, A., Horstedt, P., Hammarstrom, S., Hernell, O. & Hammarstrom, M.L. (2004).** Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*, **99**, 894-904.
- Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S. & Woese, C.R. (1977).** Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 4537-4541.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. & Pace, N.R. (2007).** Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13780-13785.
- Frankel, W.L., Zhang, W., Singh, A., Klurfeld, D.M., Don, S., Sakata, T., Modlin, I. & Rombeau, J.L. (1994).** Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology*, **106**, 375-380.
- Freeman, H.J. (2008).** Adult celiac disease in the elderly. *World J Gastroenterol*, **14**, 6911-6914.

- Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, **32**, 439-442.
- Furrie, E. (2006). A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, **55**, 141-143.
- Fyderek, K., Strus, M., Kowalska-Duplaga, K., Gosiewski, T., Wedrychowicz, A., Jedynak-Wasowicz, U., Sladek, M., Pieczarkowski, S., Adamski, P., Kochan, P. & Heczko, P.B. (2009). Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, **15**, 5287-5294.
- Garcia-Albiach, R., Pozuelo de Felipe, M.J., Angulo, S., Morosini, M.I., Bravo, D., Baquero, F. & del Campo, R. (2008). Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr*, **87**, 91-96.
- Gee, S.J. (1888). On the celiac affection. *St. Bartholomew's Hosp Rep*, **24**, 17-20.
- Gerez, C.L., Font de Valdez, G. & Rollan, G.C. (2008). Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. *Lett Appl Microbiol*, **47**, 427-432.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D. & Duerden, B.I. (1991). The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *J Med Microbiol*, **35**, 238-243.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D. & Duerden, B.I. (1992). Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, **33**, 646-650.
- Gibson, P.R., Moeller, I., Kagelari, O., Folino, M. & Young, G.P. (1992). Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol*, **7**, 165-172.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M. & Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355-1359.
- Gophna, U., Sommerfeld, K., Gophna, S., Doolittle, W.F. & Veldhuyzen van Zanten, S.J. (2006). Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*, **44**, 4136-4141.
- Gordon, H.A. & Pesti, L. (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol Rev*, **35**, 390-429.
- Gosalbes, M.J., Durban, A., Pignatelli, M., Abellan, J.J., Jimenez-Hernandez, N., Perez-Cobas, A.E., Latorre, A. & Moya, A. (2011). Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0017447.
- Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., Paparo, F., Gasperi, V., Limongelli, M.G., Cotichini, R., D'Agate, C., Tinto, N., Sacchetti, L., Tosi, R. & Stazi, M.A. (2002). The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*, **50**, 624-628.
- Green, P.H.R., Stavropoulos, S.N., Panagi, S.G., Goldstein, S.L., McMahon, D.J., Absan, H. & Neugut, A.I. (2001). Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. *Am J Gastroenterol*, **96**, 126-131.
- Greenstein, R.J. (2003). Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis*, **3**, 507-514.

- Greer, J.B. & O'Keefe, S.J. (2011).** Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Front Physiol*, **1**, 168.
- Gronlund, M.M., Arvilommi, H., Kero, P., Lehtonen, O.P. & Isolauri, E. (2000).** Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **83**, F186-192.
- Guarner, F. & Malagelada, J.R. (2003).** Gut flora in health and disease. *Lancet*, **361**, 512-519.
- Guarner, F. (2007).** Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp*, **22** Supl 2, 14-19.
- Gueimonde, M., Tolkkio, S., Korpimaki, T. & Salminen, S. (2004).** New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 4165-4169.
- Haarman, M. & Knol, J. (2006).** Quantitative real-time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 2359-2365.
- Hagiage, M. (1993).** Intestinal flora. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)*, **29**, 171-187.
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M. & Benno, Y. (2005).** Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*, **54**, 1093-1101.
- Heikkila, M.P. & Saris, P.E. (2003).** Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*, **95**, 471-478.
- Helgeland, L., Vaage, J.T., Rolstad, B., Midtvedt, T. & Brandtzaeg, P. (1996).** Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology*, **89**, 494-501.
- Hendrickson, B.A., Gokhale, R. & Cho, J.H. (2002).** Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev*, **15**, 79-94.
- Hermon-Taylor, J. (2001).** Protagonist. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis is a cause of Crohn's disease. *Gut*, **49**, 755-756.
- Hill, P.G. & McMillan, S.A. (2006).** Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. *Ann Clin Biochem*, **43**, 105-117.
- Hogberg, L., Falth-Magnusson, K., Grodzinsky, E. & Stenhammar, L. (2003).** Familial prevalence of coeliac disease: a twenty-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol*, **38**, 61-65.
- Holmes, G.K. (2001).** Potential and latent coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **13**, 1057-1060.
- Holmes, O.S. & Quigley, M. (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem*, **114**, 193-197.
- Holtmeier, W. & Caspary, W.F. (2006).** Celiac disease. *Orphanet J Rare Dis*, **1**, 3.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. & Huis in't Veld, J.H. (1998).** Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*, **41**, 85-101.

- Hooper, L.V. (2004).** Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol*, **12**, 129-134.
- Hooper, L.V. & Gordon, J.I. (2001).** Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115-1118.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T. & Gordon, J.I. (2002).** How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*, **22**, 283-307.
- Hopkins, M.J., Sharp, R. & Macfarlane, G.T. (2001).** 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.
- Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W. & Van de Wiele, T. (2011).** Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev*, **69**, 245-58.
- Hudcovic, T., Kozakova, H., Kolinska, J., Stepankova, R., Hrnčir, T. & Tlaskalova-Hogenova, H. (2009).** Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long-lasting dextran sodium sulfate treatment. *Physiol Res*, **58**, 101-110.
- Huurre, A., Kalliomaki, M., Rautava, S., Rinne, M., Salminen, S. & Isolauri, E. (2008).** Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*, **93**, 236-240.
- Johansson, M., Holmén Larsson J. & Hansson, G. (2010).** Microbes and Health Sackler Colloquium: The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Kagnoff, M.F. (2007).** Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*, **117**, 41-49.
- Kasai, H., Watanabe, K., Gasteiger, E., Bairoch, A., Isono, K., Yamamoto, S. & Harayama, S. (1998).** Construction of the gyrB Database for the Identification and Classification of Bacteria. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, **9**, 13-21.
- Kerckhoffs, A.P., Samsom, M., Van der Rest, M.E., de Vogel, J., Ben-Amor, K. & Akkermans, L.M. (2009).** Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol*, **15**, 2887-2892.
- Kinross, J., Warren, O., Basson, S., Holmes, E., Silk, D., Darzi, A. & Nicholson, J.K. (2009).** Intestinal ischemia/reperfusion injury: defining the role of the gut microbiome. *Biomark Med*, **3**, 175-192.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R. & Schmidt, T.M. (2001).** rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res*, **29**, 181-184.
- Kleessen, B., Bezirtzoglou, E. & Mättö J. (2000).** Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis*, **2**, 53-63.
- Kleessen, B., Sykura, B., Zunft, H.J. & Blaut, M. (1997).** Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr*, **65**, 1397-1402.

- Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S. & Krause, D.O. (2007).** High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, **56**, 669-675.
- Kumar, S. (1996).** A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. *Mol Biol Evol*, **13**, 584-593.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T. & Hattori, M. (2007).** Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res*, **14**, 169-181.
- Laparra, J.M. & Sanz, Y. (2010).** Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res*, **61**, 219-225.
- Le Huerou-Luron, I., Blat, S. & Boudry, G. (2010).** Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev*, **23**, 23-36.
- Leeds, J.S., Hopper, A.D. & Sanders, D.S. (2008).** Coeliac disease. *Br Med Bull*, **88**, 157-170.
- Ley, R.E., Peterson, D.A. & Gordon, J.I. (2006).** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**, 837-848.
- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Wei, H., Chen, Y., Lu, H., Zuo, J., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., Xiao, C., Smith, L.M., Yang, S., Holmes, E., Tang, H., Zhao, G., Nicholson, J.K., Li, L. & Zhao, L. (2008).** Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2117-2122.
- Lievain, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.R. & Servin, A.L. (2000).** Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, **47**, 646-652.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. & Sun, T. (2007).** Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, **67**, 1155-1163.
- Lo, C.S. & Hughes, C.V. (1996).** Identification and characterization of a protease from *Streptococcus oralis* C104. *Oral Microbiol Immunol*, **11**, 181-187.
- Lopez-Serrano, P., Perez-Calle, J.L., Carrera-Alonso, E., Perez-Fernandez, T., Rodriguez-Caravaca, G., Boixeda-de-Miguel, D. & Fernandez-Rodriguez, C.M. (2009).** Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid. *Rev Esp Enferm Dig*, **101**, 768-772.
- Lozupone, C. & Knight, R. (2005).** UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 8228-8235.
- Lucke, K., Miehle, S., Jacobs, E. & Schuppler, M. (2006).** Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative colitis. *J Med Microbiol*, **55**, 617-624.
- Luckey, T.D. (1972).** Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr*, **25**, 1292-1294.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K.H. (1998).** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, **19**, 554-568.

- Lyra, A., Krogius-Kurikka, L., Nikkila, J., Malinen, E., Kajander, K., Kurikka, K., Korpela, R. & Palva, A. (2010). Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes. *BMC Gastroenterol*, **10**, 110.
- Maccaferri, S., Vitali, B., Klinder, A., Kolida, S., Ndagijimana, M., Laghi, L., Calanni, F., Brigidi, P., Gibson, G.R. & Costabile, A. (2010). Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother*, **65**, 2556-2565.
- Macfarlane, G.T., Cummings, J.H. & Allison, C. (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol*, **132**, 1647-1656.
- Macfarlane, S., Furrie, E., Cummings, J.H. & Macfarlane, G.T. (2004). Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin Infect Dis*, **38**, 1690-1699.
- Macfarlane, S., Furrie, E., Kennedy, A., Cummings, J.H. & Macfarlane, G.T. (2005). Mucosal bacteria in ulcerative colitis. *Br J Nutr*, **93 Suppl 1**, S67-72.
- Mackie, R.I., Sghir, A. & Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*, **69**, 1035S-1045S.
- Magurran, A.E., (1988). Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey, pp. 179.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. & Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15611-15616.
- Mangin, I., Bonnet, R., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Sutren, M., Bouhnik, Y., Neut, C., Collins, M.D., Colombel, J.F., Marteau, P. & Dore, J. (2004). Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol Ecol*, **50**, 25-36.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a Laboratory manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J. & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, **55**, 205-211.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K.H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**, 593-600.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Dore, J., Corthier, G. & Furet, J.P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, **9**, 123.

- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Dore, J., Pochart, P. & Seksik, P. (2004).** Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, **20 Suppl 4**, 18-23.
- Martin, A.P. (2002).** Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 3673-3682.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. (2003).** Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*, **143(6)**, 754-758.
- Martinez, C., Antolin, M., Santos, J., Torrejon, A., Casellas, F., Borruel, N., Guarner, F. & Malagelada, J.R. (2008).** Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol*, **103**, 643-648.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D. & Garcia-Gil, L.J. (2006).** Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis*, **12**, 1136-1145.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. & Tanaka, R. (2004).** Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 167-173.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R. & Oyaizu, H. (1998).** Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett*, **167**, 113-121.
- Matsumoto, M., Sakamoto, M., Hayashi, H. & Benno, Y. (2005).** Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods*, **61**, 305-319.
- McCartney, A.L., Wenzhi, W. & Tannock, G.W. (1996).** Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 4608-4613.
- McCracken, V.J., Simpson, J.M., Mackie, R.I. & Gaskins, H.R. (2001).** Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *J Nutr*, **131**, 1862-1870.
- McGough, N. & Cummings, J.H. (2005).** Coeliac disease: a diverse clinical syndrome caused by intolerance of wheat, barley and rye. *Proc Nutr Soc*, **64**, 434-450.
- Medina, M., De Palma, G., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. (2008).** Bifidobacterium strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. *J Inflamm (Lond)*, **5**, 19.
- Miller, J. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU.
- Mitsuoka, T. (1992).** Intestinal flora and aging. *Nutr Rev*, **50**, 438-446.
- Montesi, A., García-Albiach, R., Pozuelo, M.J., Pintado, C., Goñi, I. & Rotger, R. (2005).** Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *Int J Food Microbiol*, **98**, 281-289.

- Moreau, M.C., Ducluzeau, R., Guy-Grand, D. & Muller, M.C. (1978).** Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun*, **21**, 532-539.
- Moreno, C.E. & Halffer, G. (2001).** Spatial and temporal analysis of the  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  diversities of bats in a fragmented landscape. *Biodiversity and Conservation*, **10**, 367-382.
- Morón, B., Cebolla, A., Manyani, H., Alvarez-Maqueda, M., Megías, M., Thomas Mdel, C., López, M.C. & Sousa, C. (2008).** Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am J Clin Nutr*, **87**, 405-414.
- Morotomi, N., Fukuda, K., Nakano, M., Ichihara, S., Oono, T., Yamazaki, T., Kobayashi, N., Suzuki, T., Tanaka, Y. & Taniguchi, H. (2011).** Evaluation of Intestinal Microbiotas of Healthy Japanese Adults and Effect of Antibiotics Using the 16S Ribosomal RNA Gene Based Clone Library Method. *Biol Pharm Bull*, **34**, 1011-1020.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*, **155**, 335-350.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, 127-141.
- Myers, R.M., Maniatis, T. & Lerman, L.S. (1987).** Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, **155**, 501-527.
- Mylonaki, M., Rayment, N.B., Rampton, D.S., Hudspith, B.N. & Brostoff, J. (2005).** Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, **11**, 481-487.
- Nadal, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. (2007).** Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol*, **56**, 1669-1674.
- Neish, A.S. (2009).** Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, **136**, 65-80.
- Neu, J., Douglas-Escobar, M. & Lopez, M. (2007).** Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr Clin Pract*, **22**, 174-182.
- Neut, C., Bulois, P., Desreumaux, P., Membre, J.M., Lederman, E., Gambiez, L., Cortot, A., Quandalle, P., van Kruiningen, H. & Colombel, J.F. (2002).** Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, **97**, 939-946.
- Nieuwenhuizen, W.F., Pieters, R.H., Knippels, L.M., Jansen, M.C. & Koppelman, S.J. (2003).** Is *Candida albicans* a trigger in the onset of coeliac disease? *Lancet*, **361(9375)**, 2152-2154.
- Noor, S.O., Ridgway, K., Scovell, L., Kemsley, E.K., Lund, E.K., Jamieson, C., Johnson, I.T. & Narbad, A. (2010).** Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC Gastroenterol*, **10**, 134.

- Noverr, M.C. & Huffnagle, G.B. (2004).** Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol. Dec*, **12**, 562-568.
- Nubel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. (1997).** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 3327-3332.
- Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S. & Kimura, S. (2002).** Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb Pathog*, **33**, 33-41.
- Omoike, I.U. & Abiodun, P.O. (1989).** Upper small intestinal microflora in diarrhea and malnutrition in Nigerian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **9**, 314-321.
- O'Toole, P.W. & Claesson M.J. (2010).** Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, **20**, 281-291.
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Folsch, U.R., Timmis, K.N. & Schreiber, S. (2004).** Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, **53**, 685-693.
- Ou, G., Hedberg, M., Horstedt, P., Baranov, V., Forsberg, G., Drobni, M., Sandstrom, O., Wai, S.N., Johansson, I., Hammarstrom, M.L., Hernell, O. & Hammarstrom, S. (2009).** Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*, **104**, 3058-3067.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J. & Olsen, G.J. (1985).** Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM Am Soc Microbiol News*, **1**, 4-12.
- Parracho, H., McCartney, A.L. & Gibson, G.R. (2007).** Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proc Nutr Soc*, **66**, 405-411.
- Pauley, J.W. (1954).** Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J*, **2**, 1318-1321.
- Peet, R.K. (1974).** The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **5**, 285-307.
- Pei, Z., Bini, E.J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F. & Blaser, M.J. (2004).** Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4250-4255.
- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A. & Versalovic, J. (2009).** Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*, **55**, 856-866.
- Pitcher, M.C., Beatty, E.R. & Cummings, J.H. (2000).** The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut*, **46**, 64-72.
- Pizarro, T.T., Arseneau, K.O. & Cominelli, F. (2000).** Lessons from genetically engineered animal models XI. Novel mouse models to study pathogenic mechanisms of Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **278**, G665-669.
- Plenge, R.M. (2010).** Unlocking the pathogenesis of celiac disease. *Nat Genet*, **42**, 281-282.
- Ponnusamy, K., Choi, J.N., Kim, J., Lee, S.Y. & Lee, C.H. (2011).** Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *J Med Microbiol*, **60**, 817-827.

- Poulsen, K., Reinholdt, J., Jespersgaard, C., Boye, K., Brown, T.A., Hauge, M. & Kilian, M. (1998). A comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect Immun*, **66**, 181-190.
- Pozuelo de Felipe, M.J., García-Albiach R.J., Montesi Libois, A., Rodríguez Borrajo, C., Del Campo, R. & Rotger, R. (2005). Monitoring of the succession of bacterial populations in infant faeces by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **4**, 205-211.
- Pryde, S.E., Duncan, S.H., Hold, G.L., Stewart, C.S. & Flint, H.J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett*, **217**, 133-139.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P. & Ehrlich, S.D. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59-65.
- Rajilic-Stojanovic, M., Smidt, H. & de Vos, W.M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol*, **9**, 2125-2136.
- Rastall, R.A. (2004). Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr*, **134**, 2022S-2026S.
- Reuter, G. (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol*, **2**, 43-53.
- Ricci, V., Romano, M. & Boquet, P. (2011). Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World J Gastroenterol*, **17**, 1383-99.
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L. & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*, **97**, 1166-1177.
- Rizzello, C.G., De Angelis, M., Di Cagno, R., Camarica, A., Silano, M., Losito, I., De Vincenzi, M., De Bari, M.D., Palmisano, F., Maurano, F., Gianfrani, C. & Gobbetti, M. (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 4499-4507.
- Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Sutren, M., Kremetscki, M.N., Andrieux, C., Furet, J.P., Tailliez, P., Levenez, F., Mogenet, A., Bresson, J.L., Meance, S., Cayuela, C., Leplingard, A. & Dore, J. (2006). Effects of orally administered Lactobacillus casei DN-114 001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans. *Br J Nutr*, **95**, 421-429.
- Rollan, G., De Angelis, M., Gobbetti, M. & de Valdez, G.F. (2005). Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *J Appl Microbiol*, **99**, 1495-1502.

- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J. & Goodman, R.M. (2000).** Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 2541-2547.
- Rosenbaum, V. & Riesner, D. (1987).** Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys Chem*, **26**, 235-246.
- Rowan, F.E., Docherty, N.G., Coffey, J.C. & O'Connell, P.R. (2009).** Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *Br J Surg*, **96**, 151-158.
- Ruseler-van Embden, J.G. & Both-Patoir, H.C. (1983).** Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 125-132.
- Ryan, P., Kelly, R.G., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J. & Shanahan, F. (2004).** Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol*, **99**, 1539-1543.
- Sainsus, N., Cattori, V., Lepadatu, C. & Hofmann-Lehmann, R. (2008).** Liquid culture medium for the rapid cultivation of *Helicobacter pylori* from biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **27**, 1209-1217.
- Saitoh, S., Noda, S., Aiba, Y., Takagi, A., Sakamoto, M., Benno, Y., Koga, Y. (2002).** *Bacteroides ovatus* as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, **9**, 54-59.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A Laboratory manual. New York. Cold Spring Harbor Press.
- Sánchez, E., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. (2010).** Intestinal *Bacteroides* species associated with coeliac disease. *J Clin Pathol*, **63**, 1105-1111.
- Sanz, Y., Nadal, I. & Sánchez, E. (2007b).** Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, **2**, 148-156.
- Sanz, Y., Sánchez, E., Marzotto, M., Calabuig, M., Torriani, S. & Dellaglio, F. (2007a).** Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **51**, 562-568.
- Sanz, Y. & Toldra, F. (2001).** Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 1815-1820.
- Sartor, R.B. (2005).** Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease?. *Gut*, **54**, 896-898.
- Sartor, R.B. (2006).** Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, **3**, 390-407.
- Sasaki, M., Sitaraman, S.V., Babbitt, B.A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Garrett, N., Alpern, J.A., Akyildiz, A., Theiss, A.L., Nusrat, A. & Klapproth, J.M. (2007).** Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest*, **87**, 1042-1054.

- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D., Saarela, M. & de Vos, W.M. (2001a). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 504-513.
- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D., Saarela, M. & De Vos, W.M. (2001b). Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal bifidobacterium populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. *Syst Appl Microbiol*, **24**, 227-231.
- Scanlan, P.D., Shanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J.R. (2006). Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J Clin Microbiol*, **44**, 3980-3988.
- Scheppach, W. & Weiler, F. (2004). The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **7**, 563-567.
- Schippa, S., Iebba, V., Barbato, M., Di Nardo, G., Totino, V., Checchi, M.P., Longhi, C., Maiella, G., Cucchiara, S., Conte, M.P. (2010). A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. *BMC Microbiol*, **10**, 175.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. & Weber, C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 7537-7541.
- Schwartz, D., Shafran, I., Romero, C., Piromalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W. & Naser, S.A. (2000). Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in tissue from Crohn's disease patients. *Clin Microbiol Infect*, **6**, 303-307.
- Sechi, L.A., Mura, M., Tanda, F., Lissia, A., Solinas, A., Fadda, G. & Zanetti, S. (2001). Identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization. *J Clin Microbiol*, **39**, 4514-4517.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R. & Dore, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, **52**, 237-242.
- Shanahan, F. (2002). Gut flora in gastrointestinal disease. *Eur J Surg Suppl*, **587**, 47-52.
- Shiba, T., Aiba, Y., Ishikawa, H., Ushiyama, A., Takagi, A., Mine, T. & Koga, Y. (2003). The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol*, **47**, 371-378.
- Shiner, M., Waters, T.E. & Gray, J.D. (1963). Culture Studies of the Gastrointestinal Tract with a Newly Devised Capsule. Results of Tests in Vitro and in Vivo. *Gastroenterology*, **45**, 625-632.
- Shroff, K.E., Meslin, K. & Cebra, J.J. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun*, **63**, 3904-3913.
- Sliepen, I., Van Damme, J., Van Essche, M., Loozen, G., Quirynen, M. & Teughels, W. (2009). Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res*, **88**, 1026-1030.

- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Tran Van Nhieu, J. & Furet, J.P. (2011).** Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0016393.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P. & Tannock, G.W. (2008).** Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis*, **14**, 858-867.
- Sokol, H., Lepage, P., Seksik, P., Dore, J. & Marteau, P. (2006a).** Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*, **44**, 3172-3177.
- Sokol, H., Lepage, P., Seksik, P., Dore, J. & Marteau, P. (2007).** Molecular comparison of dominant microbiota associated with injured versus healthy mucosa in ulcerative colitis. *Gut*, **56**, 152-154.
- Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P. & Dore, J. (2006b).** Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, **12**, 106-111.
- Sollid, L.M. & Gray, G.M. (2004).** A role for bacteria in celiac disease? *Am J Gastroenterol*, **99**, 905-906.
- Sollid, L.M. & Khosla, C. (2011).** Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med*, **269**, 604-613.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V. & Gordon, J.I. (2002).** Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15451-15455.
- Stene, L.C., Honeyman, M.C., Hoffenberg, E.J., Haas, J.E., Sokol, R.J., Emery, L., Taki, I., Norris, J.M., Erlich, H.A., Eisenbarth, G.S. & Rewers, M. (2006).** Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*, **101**, 2333-2340.
- Stephani, J., Radulovic, K. & Niess, J.H. (2011).** Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **59**, 161-177.
- Suau, A., Rochet, V., Sghir, A., Gramet, G., Brewaeys, S., Sutren, M., Rigottier-Gois, L. & Doré, J. (2001).** *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst Appl Microbiol*, **24**, 139-145.
- Sullivan, A., Tornblom, H., Lindberg, G., Hammarlund, B., Palmgren, A.C., Einarsson, C. & Nord, C.E. (2003).** The micro-flora of the small bowel in health and disease. *Anaerobe*, **9**, 11-14.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M. & Lochs, H. (2002).** Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **122**, 44-54.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P. & Lochs, H. (2005).** Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*, **43**, 3380-3389.
- Swift, S., Vaughan, E.E. & de Vos, M.M. (2000).** Quorum sensing within the gut ecosystem. *Microb. Ecol. Healthy Dis*, **2**, 81-92.

- Takaishi, H., Matsuki, T., Nakazawa, A., Takada, T., Kado, S., Asahara, T., Kamada, N., Sakuraba, A., Yajima, T., Higuchi, H., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Nomoto, K., Tanaka, R. & Hibi, T. (2008).** Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol*, **298**, 463-472.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, **24**, 1596-1599.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, **10**, 512-526.
- Tannock, G.W. (1983).** Control of gastrointestinal pathogens by normal flora. En: *Current Perspective in Microbial Biology*. M.J. Klug, C.A. Reddy (ed), American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 374-382.
- Tannock, G.W. (1995).** More than smell: the complexity of the normal microflora. En: *Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*, Chapman and Hall, Londres, pp. 1-35.
- Tannock, G.W. (2001).** Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*, **73**, 410S-414S.
- Tannock, G.W. (2005).** New perceptions of the gut microbiota: implications for future research. *Gastroenterol Clin North Am*, **34**, 361-382.
- Tannock, G.W., Munro, K., Bibiloni, R., Simon, M.A., Hargreaves, P., Gopal, P., Harmsen, H. & Welling, G. (2004).** Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 2129-2136.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.P., Ugarte, E., Munoz-Tamayo, R., Paslier, D.L., Nalin, R., Dore, J. & Leclerc, M. (2009).** Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*, **11**, 2574-2584.
- Teitelbaum, J.E. & Walker, W.A. (2002).** Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr*, **22**, 107-138.
- Temmerman, R., Masco, L., Vanhoutte, T., Huys, G. & Swings, J. (2003).** Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 6380-6385.
- Thompson-Chagoyan, O.C., Maldonado, J. & Gil, A. (2007).** Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci*, **52**, 2069-2077.
- Thompson, T., Dennis, M., Higgins, L.A., Lee, A.R. & Sharrett, M.K. (2005).** Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? *J Hum Nutr Diet*, **18**, 163-169.
- Tjellstrom, B., Stenhammar, L., Hogberg, L., Falth-Magnusson, K., Magnusson, K.E., Midtvedt, T., Sundqvist, T., Houlston, R., Popat, S. & Norin, E. (2007).** Gut microflora associated characteristics in first-degree relatives of children with celiac disease. *Scand J Gastroenterol*, **42**, 1204-1208.

- Tjellström, B., Stenhammar, L., Högberg, L., Fälth-Magnusson, K., Magnusson, K.E., Midtvedt, T., Sundqvist, T. & Norin, E. (2005).** Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am J Gastroenterol*, **100**, 2784-2788.
- Torres, M.I., Lopez Casado, M.A. & Rios, A. (2007).** New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol*, **13**, 1156-1161.
- Torsvik, V. Øvreas L. & Thingstad, T.F. (2002).** Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, **296**, 1064-1066.
- Vaishampayan, P.A., Kuehl, J.V., Froula, J.L., Morgan, J.L., Ochman, H. & Francino, M.P. (2010).** Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol Evol*, **2**, 53-66.
- Van Beek, S. & Priest, F.G. (2002).** Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 297-305.
- Van Belzen, M.J., Meijer, J.W., Sandkuijl, L.A., Bardoel, A.F., Mulder, C.J., Pearson, P.L., Houwen, R.H. & Wijmenga, C. (2003).** A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology*, **125**, 1032-1041.
- Van De Kamer, J.H., Weijers, H.A. & Dicke, W.K. (1953).** Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr*, **42**, 223-231.
- Van Der Gucht, K., Sabbe, K., De Meester, L., Vloemans, N., Zwart, G., Gillis, M. & Vyverman, W. (2001).** Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environ Microbiol*, **3**, 680-690.
- Van der Waaij, D. (1992).** History of recognition and measurement of colonization resistance of the digestive tract as an introduction to selective gastrointestinal decontamination. *Epidemiol Infect*, **109**, 315-326.
- Van Heel, D.A. & West, J. (2006).** Recent advances in coeliac disease. *Gut*, **55**, 1037-1046.
- Vasquez, N., Mangin, I., Lepage, P., Seksik, P., Duong, J.P., Blum, S., Schiffrin, E., Suau, A., Allez, M., Vernier, G., Tréton, X., Doré, J., Marteau, P. & Pochart, P. (2007).** Patchy distribution of mucosal lesions in ileal Crohn's disease is not linked to differences in the dominant mucosa-associated bacteria: a study using fluorescence in situ hybridization and temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis*, **13**, 684-692.
- Vaughan, E.E., Schut, F., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M. & Akkermans, A.D. (2000).** A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol*, **1**, 1-12.
- Ventura, M., O'Flaherty, S., Claesson, M.J., Turrone, F., Klaenhammer, T.R., van Sinderen, D. & O'Toole, P.W. (2009).** Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 61-71.
- Vivas, S., Ruiz de Morales, J.M., Fernandez, M., Hernando, M., Herrero, B., Casqueiro, J. & Gutierrez, S. (2008).** Age-related clinical, serological, and histopathological features of celiac disease. *Am J Gastroenterol*, **103**, 2360-2365.

- Waidmann, M., Bechtold, O., Frick, J.S., Lehr, H.A., Schubert, S., Dobrindt, U., Loeffler, J., Bohn, E. & Autenrieth, I.B. (2003). *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*, **125**, 162-177.
- Walker, W.A. & Duffy, L.C. (1998). Diet and bacterial colonization: role of probiotics. *J Nutr Biochem*, **9**, 668-675.
- Walker, A.W., Sanderson, J.D., Churcher, C., Parkes, G.C., Hudspith, B.N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G. & Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol*, **11**, 7.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K. & Hammes, W.P. (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 2578-2585.
- Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K. & Alatossava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 297-303.
- Wang, M., Ahrne, S., Jeppsson, B. & Molin, G. (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol*, **54**, 219-231.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. & Cole, J.R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 5261-5267.
- Wang, X., Heazlewood, S.P., Krause, D.O. & Florin, T.H. (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol*, **95**, 508-520.
- Watanabe, K., Mikamo, H. & Tanaka, K. (2007). [Clinical significance of sulfate-reducing bacteria for ulcerative colitis]. *Nihon Rinsho*, **65**, 1337-1346.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*, **24**, 115-119.
- Willing, B., Halfvarson, J., Dicksved, J., Rosenquist, M., Järnerot, G., Engstrand, L., Tysk, C. & Jansson, J.K. (2009). Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, **15**, 653-660.
- Willing, B.P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A.F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J.K. & Engstrand, L. (2010). A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*, **139**, 1844-1854.
- Wilson, M. (2005). *Microbial inhabitants of humans their ecology and role in health and disease*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Cambridge University Press. pp. 284-294
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, **51**, 221-271.
- Xaus, J. (2004). Papel fisiológico de las bacterias comensales. *Enfermedad inflamatoria intestinal al día*, **3**, 82-89.

- Young, S.L., Simon, M.A., Baird, M.A., Tannock, G.W., Bibiloni, R., Spencely, K., Lane, J.M., Fitzharris, P., Crane, J., Town, I., Addo-Yobo, E., Murray, C.S. & Woodcock, A. (2004).** Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol*, **11**, 686-690.
- Yun, J.H., Yim, D.S., Kang, J.Y., Kang, B.Y., Shin, E.A., Chung, M.J., Kim, S.D., Baek, D.H., Kim, K. & Ha, N.J. (2005).** Identification of *Lactobacillus ruminus* SPM0211 isolated from healthy Koreans and its antimicrobial activity against some pathogens. *Arch Pharm Res*, **28**, 660-666
- Zhang, M., Liu, B., Zhang, Y., Wei, H., Lei, Y. & Zhao, L. (2007).** Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and *Clostridium leptum* subgroup in patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*, **45**, 496-500.
- Zhang, Y.Q., Ren, S.X., Li, H.L., Wang, Y.X., Fu, G., Yang, J., Qin, Z.Q., Miao, Y.G., Wang, W.Y., Chen, R.S., Shen, Y., Chen, Z., Yuan, Z.H., Zhao, G.P., Qu, D., Danchin, A. & Wen, Y.M. (2003).** Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol*, **49**, 1577-1593.
- Zhu, Y., Michelle Luo, T., Jobin, C. & Young, H.A. (2011).** Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett*, **309**, 119-127.
- Zilberstein, B., Quintanilha, A.G., Santos, M.A., Pajecski, D., Moura, E.G., Alves, P.R., Maluf Filho, F., de Souza, J.A. & Gama-Rodrigues, J. (2007).** Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo)*, **62**, 47-54.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D. & De Vos, W.M. (1998).** Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 3854-3859.
- Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D., Abee, T. & de Vos, W.M. (2001).** DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol*, **24**, 405-410.
- Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I. & Gaskins, H.R. (2004).** Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*, **134**, 465-472.
- Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D. & de Vos, W.M. (2002).** Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 3401-3407.

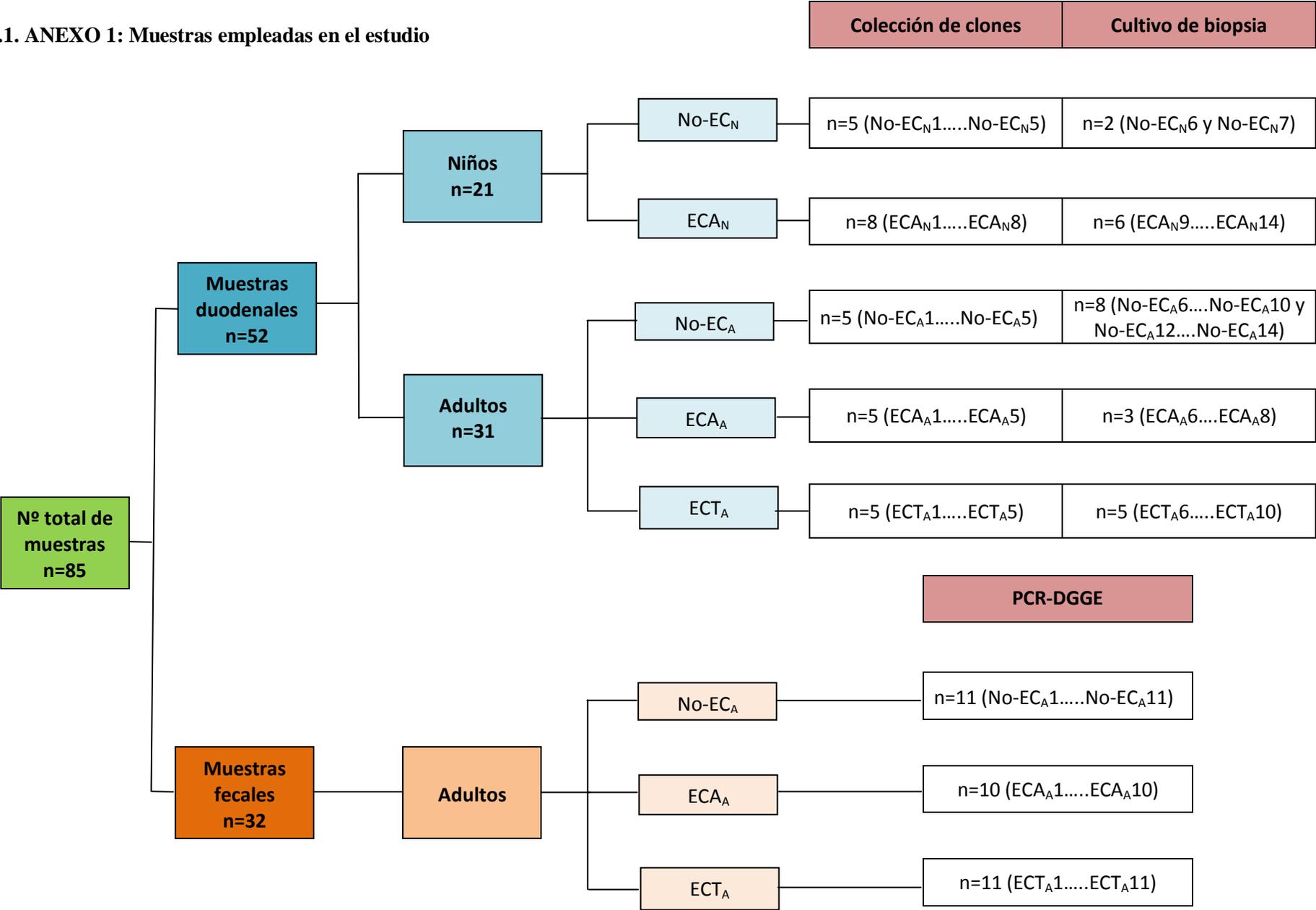
# **ANEXOS**

---

---



1.1. ANEXO 1: Muestras empleadas en el estudio



## 1.2. ANEXO 2: Secuencia del gen ARN ribosomal 16S

---

AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCG

**Cebador 27 F**

AACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG

**V1**

AAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA

**V2**

CCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTTGTGGT

GGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA

ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG

**Cebador HDA1**

CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGA

GGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT

**V3**

CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC

**Cebador HDA2**

GCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGA

**V4**

TACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA

GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA

CGGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAG

GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGC

**V5**

CGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT

**Cebador E939R**

TCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAAAAGG

**Cebador F968**

**V6**

TGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGG

GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT **CCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGA**ACTCAA

**V7**

**GGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGA**

CCAGGGCTACACACGTGCTACAATGG **CGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGA**

**V8**

**CCTCATAAAGTGC**GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGC

TAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCC **GGGCCTTG**TACACACCGCCCGTCA

**Cebador R1401**

CACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAA **G**TAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTT

**V9**

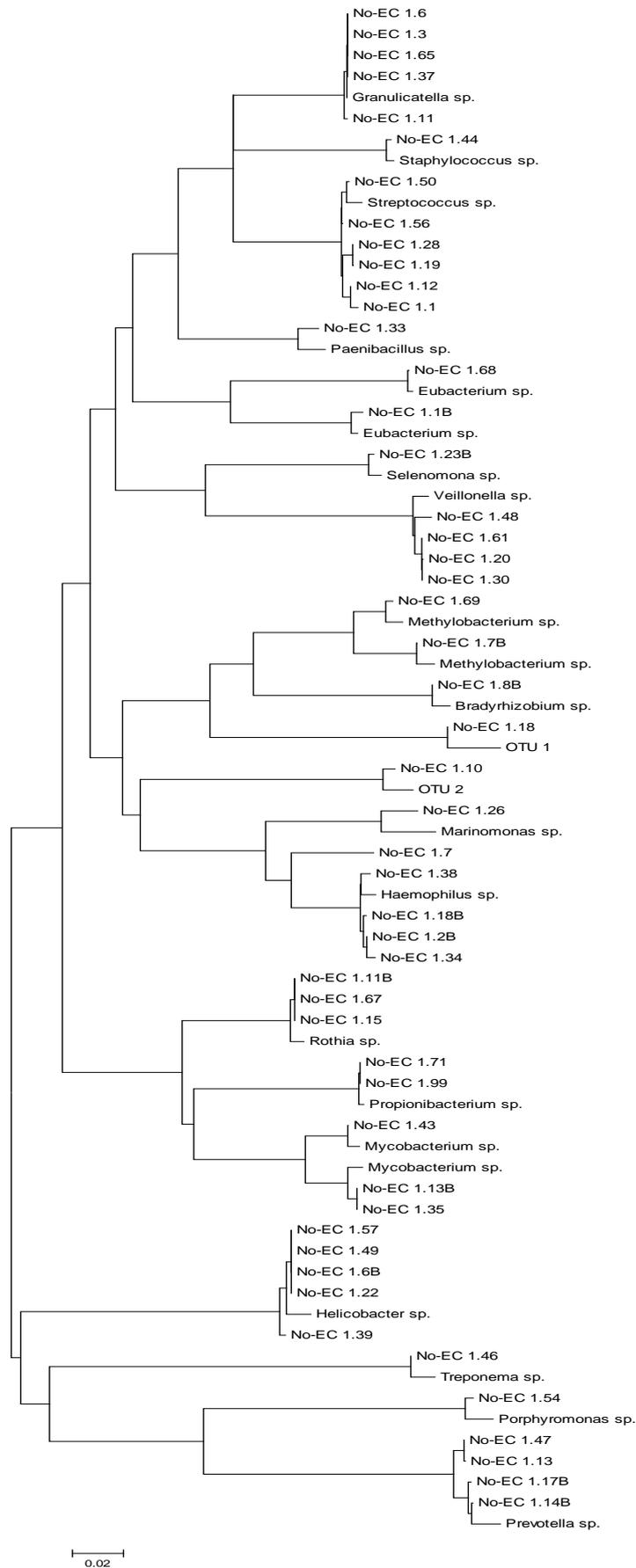
GTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACC

TCCT

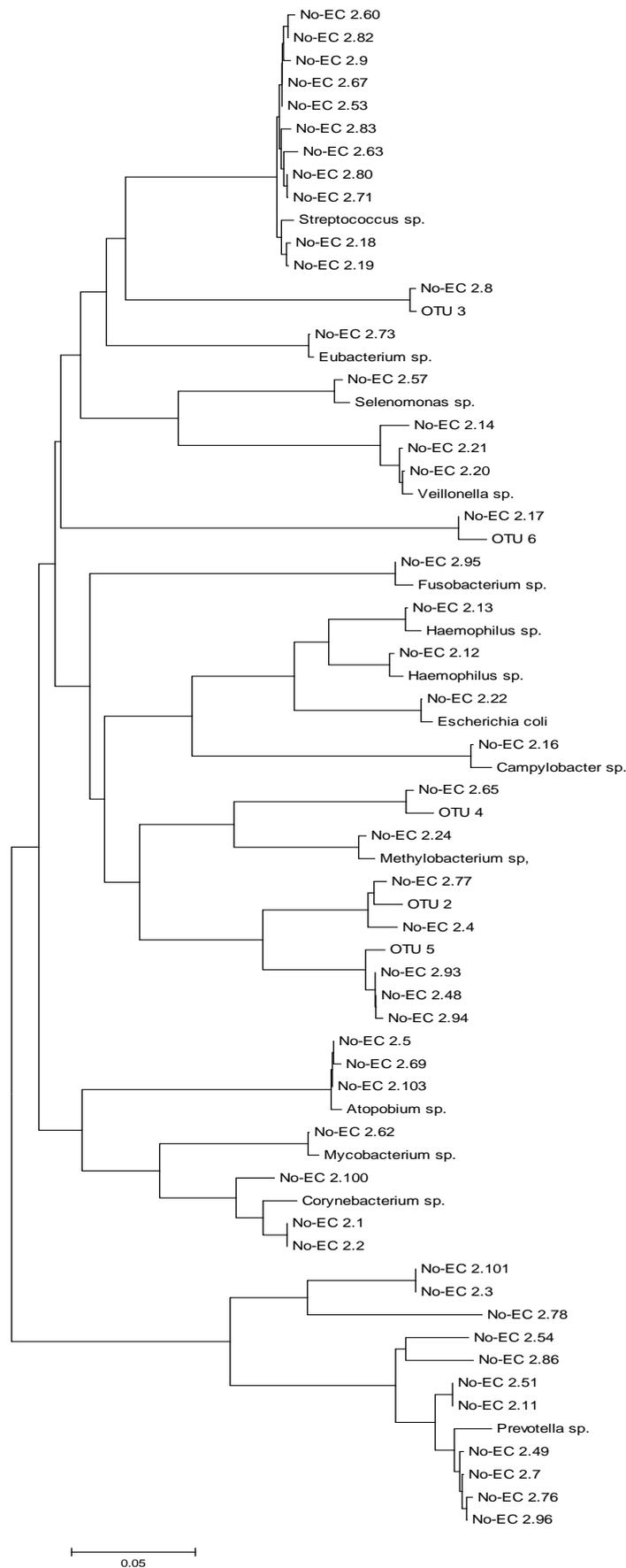
---

Secuencia de nucleótidos del gen del ARN ribosomal 16S de *Escherichia coli*. Las zonas sombreadas de color gris representan zonas de varibilidad, mientras que las regiones coloreadas y subrayadas se corresponden con zonas conservadas. En cada una de las cajas coloreadas se indican las parejas de cebadores universales empleadas en los diferentes experimentos.

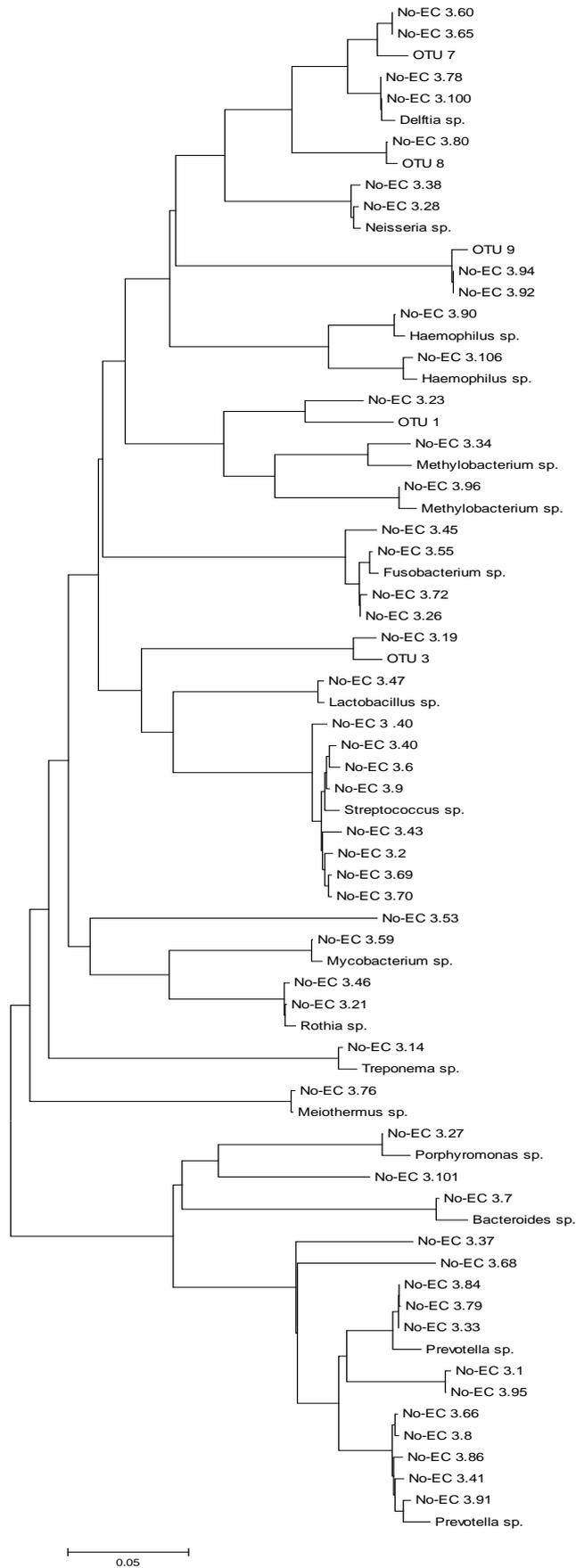
### 1.3. ANEXO 3: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>A</sub> 1



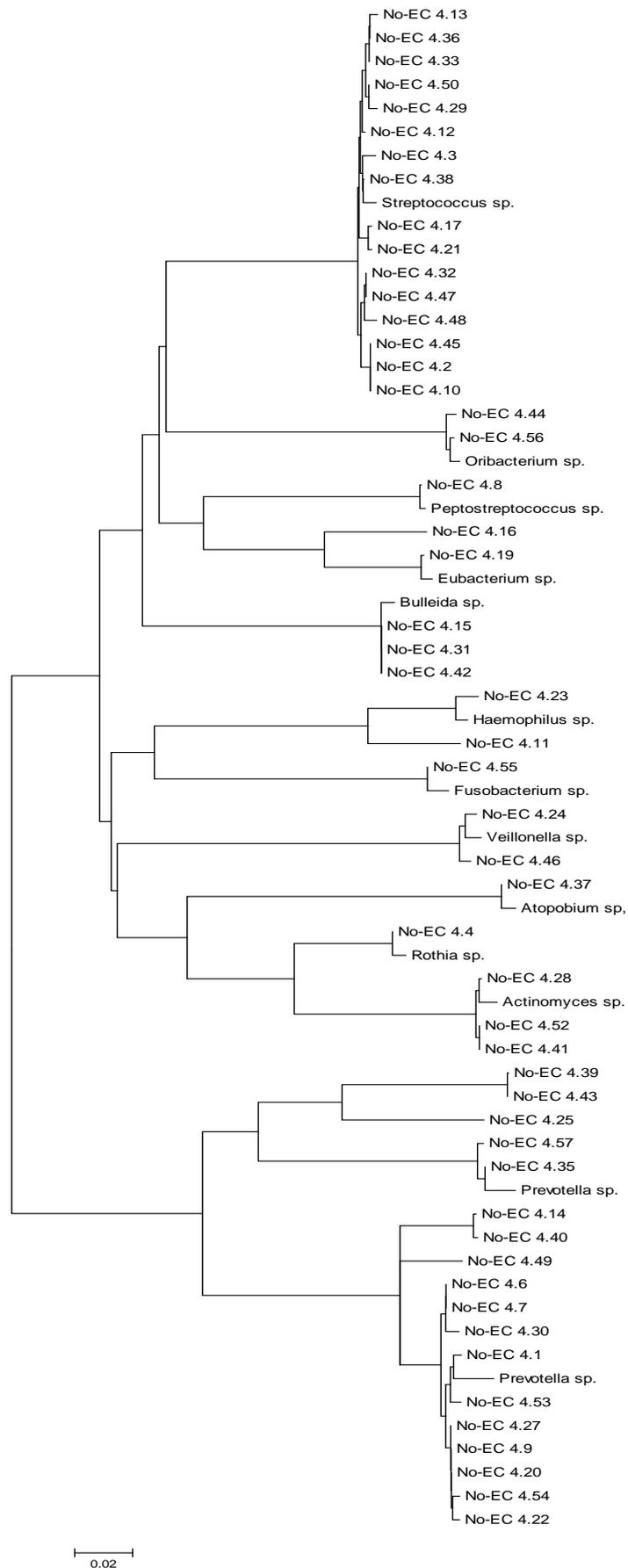
1.4. ANEXO 4: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>A</sub> 2



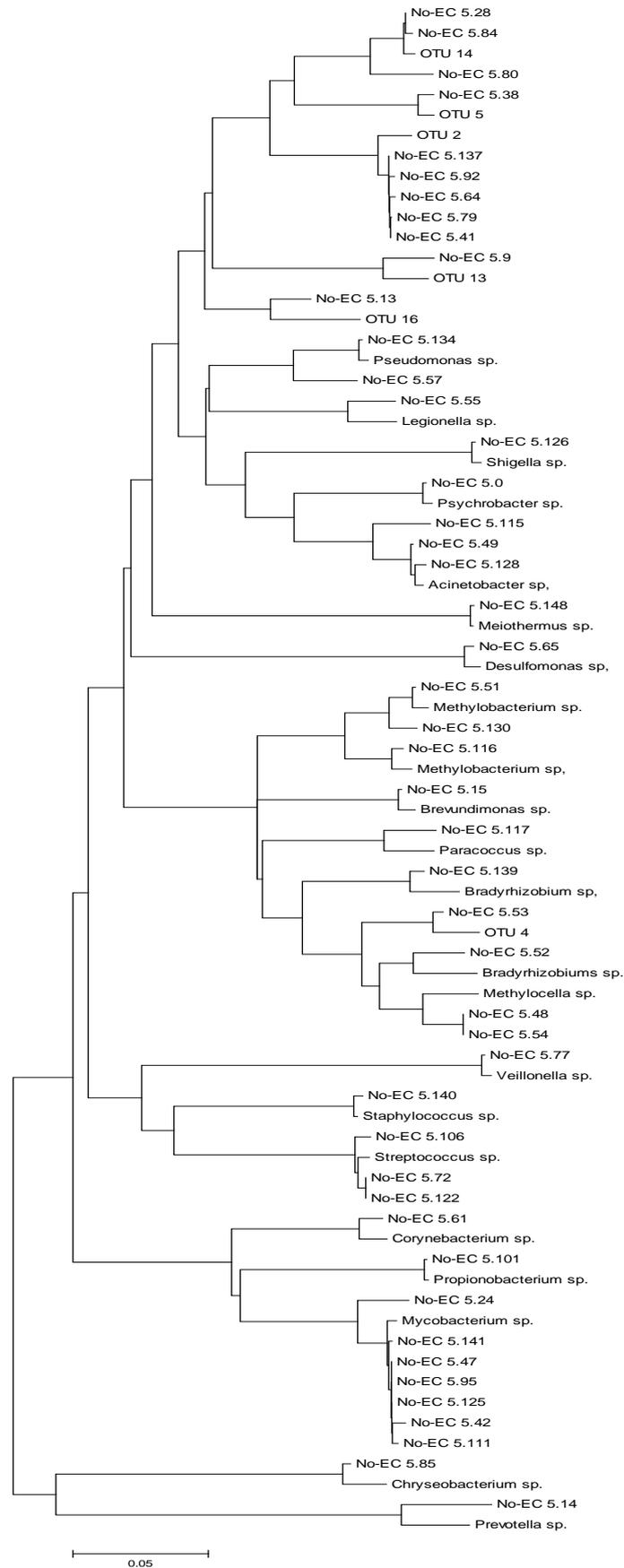
### 1.5. ANEXO 5: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>A</sub> 3



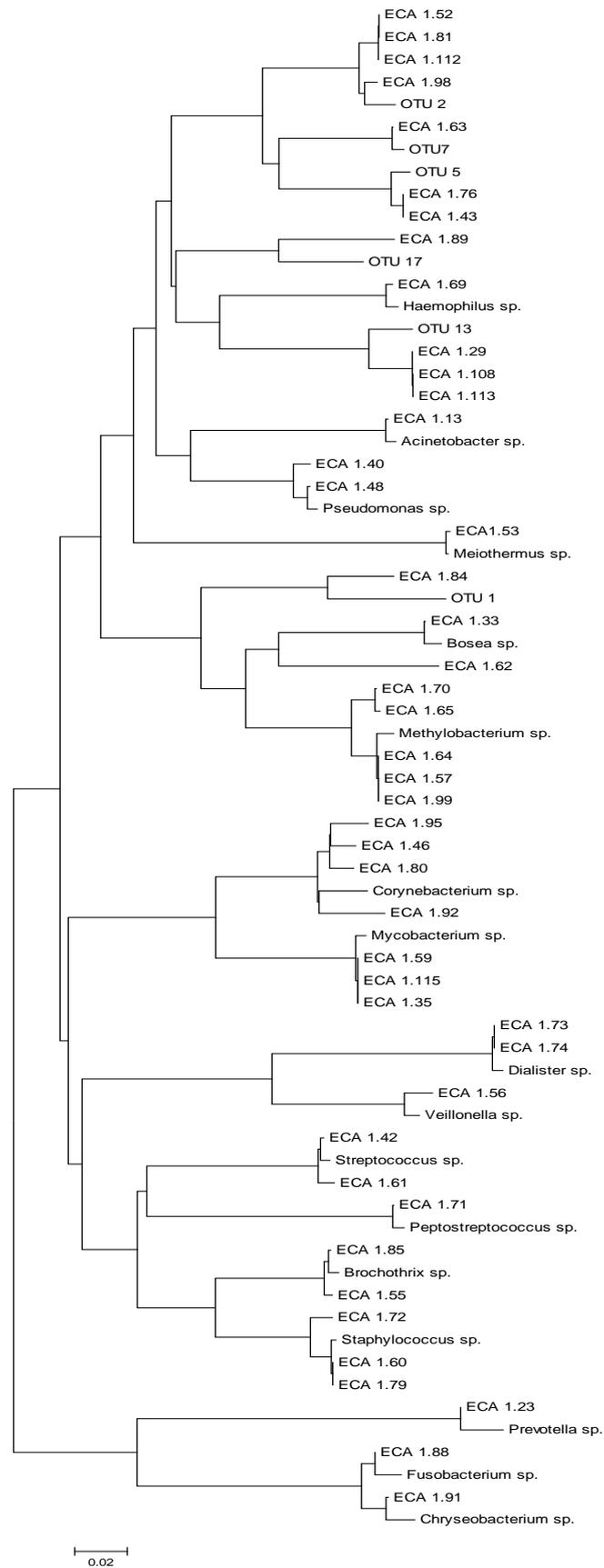
1.6. ANEXO 6: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>A</sub> 4



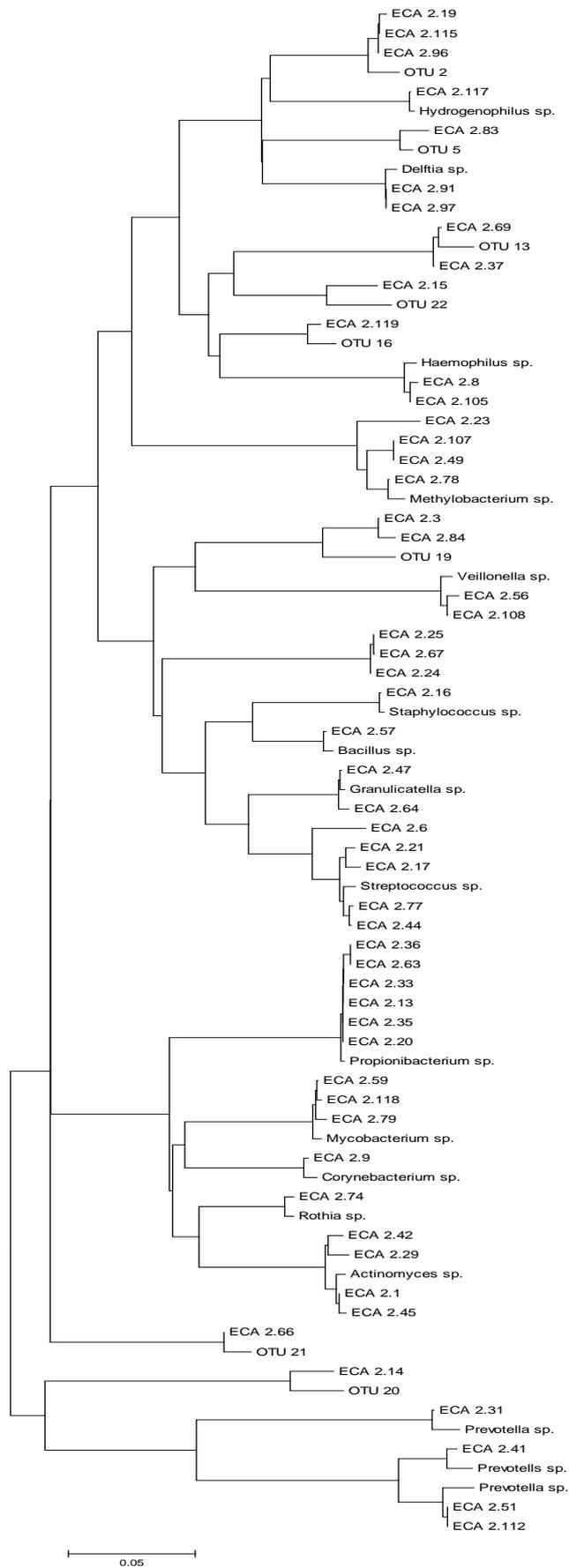
### 1.7. ANEXO 7: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>A</sub> 5



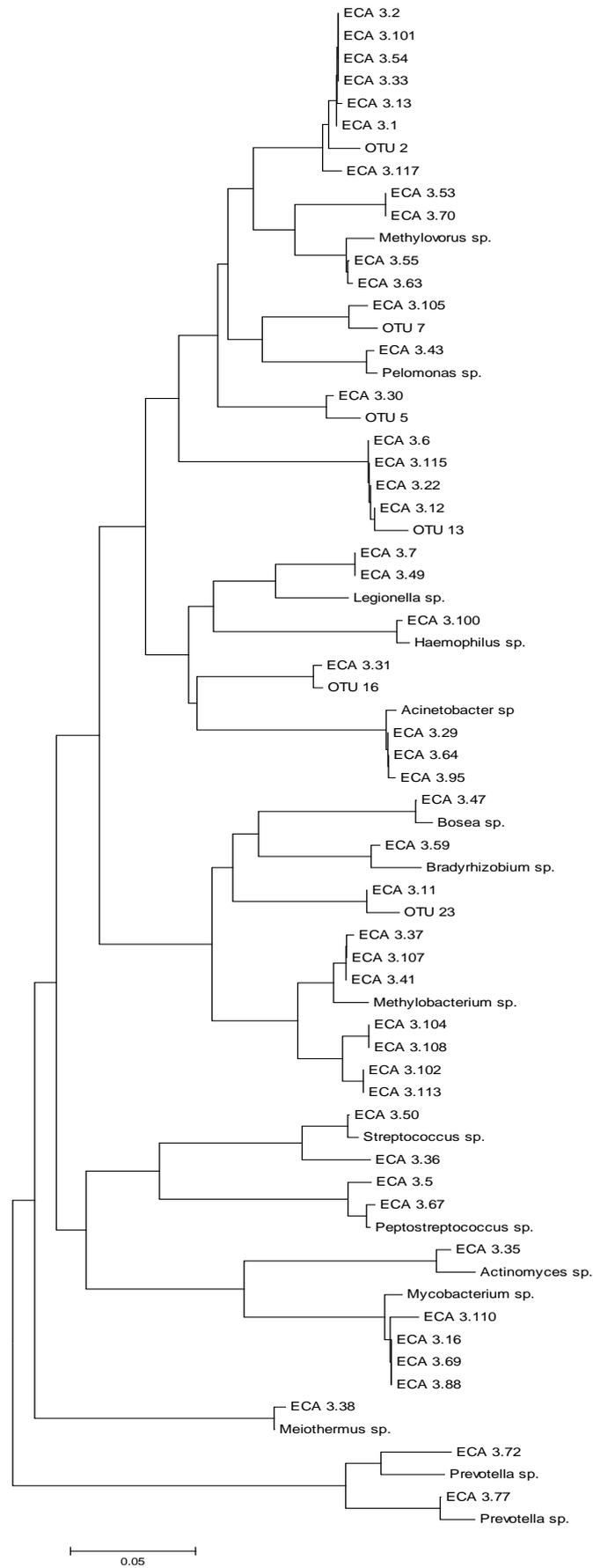
1.8. ANEXO 8: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>A</sub> 1



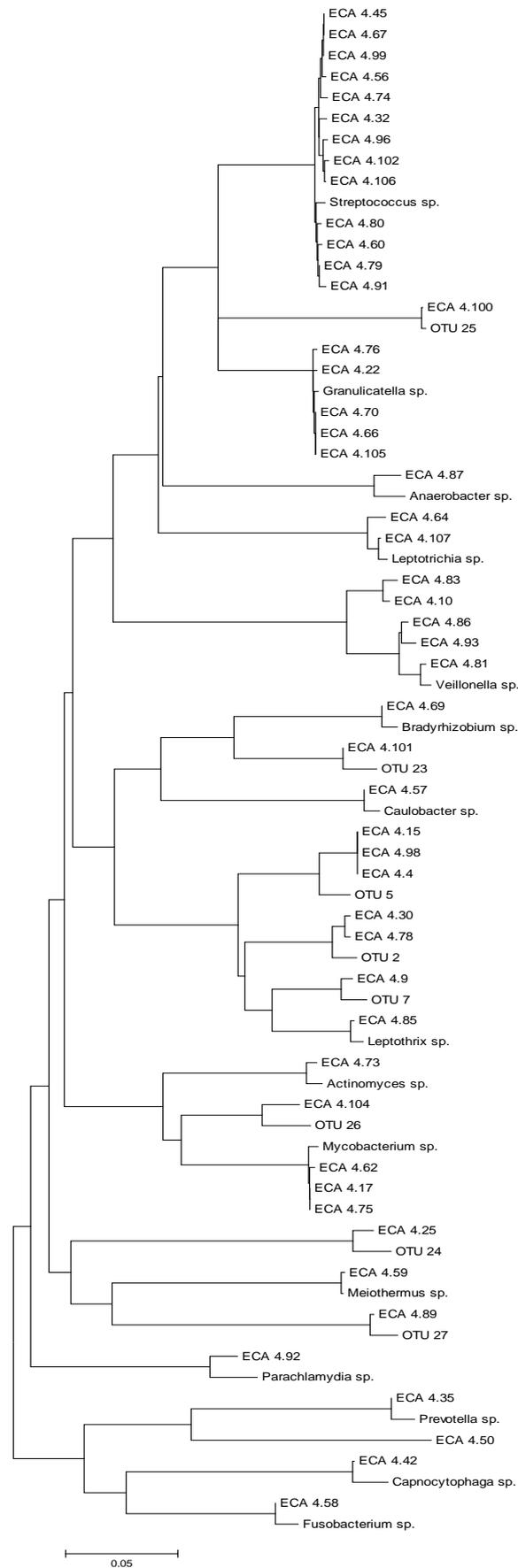
1.9. ANEXO 9: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>A</sub> 2



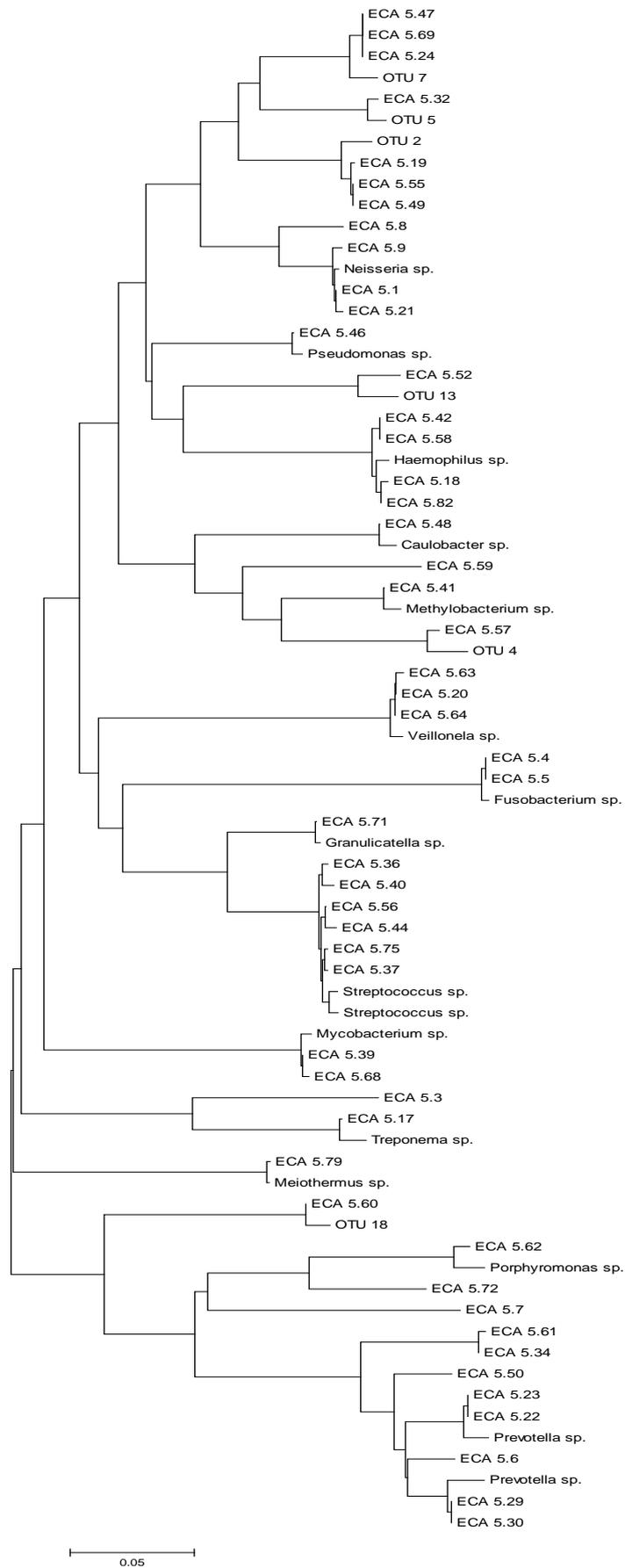
1.10. ANEXO 10: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>A</sub> 3



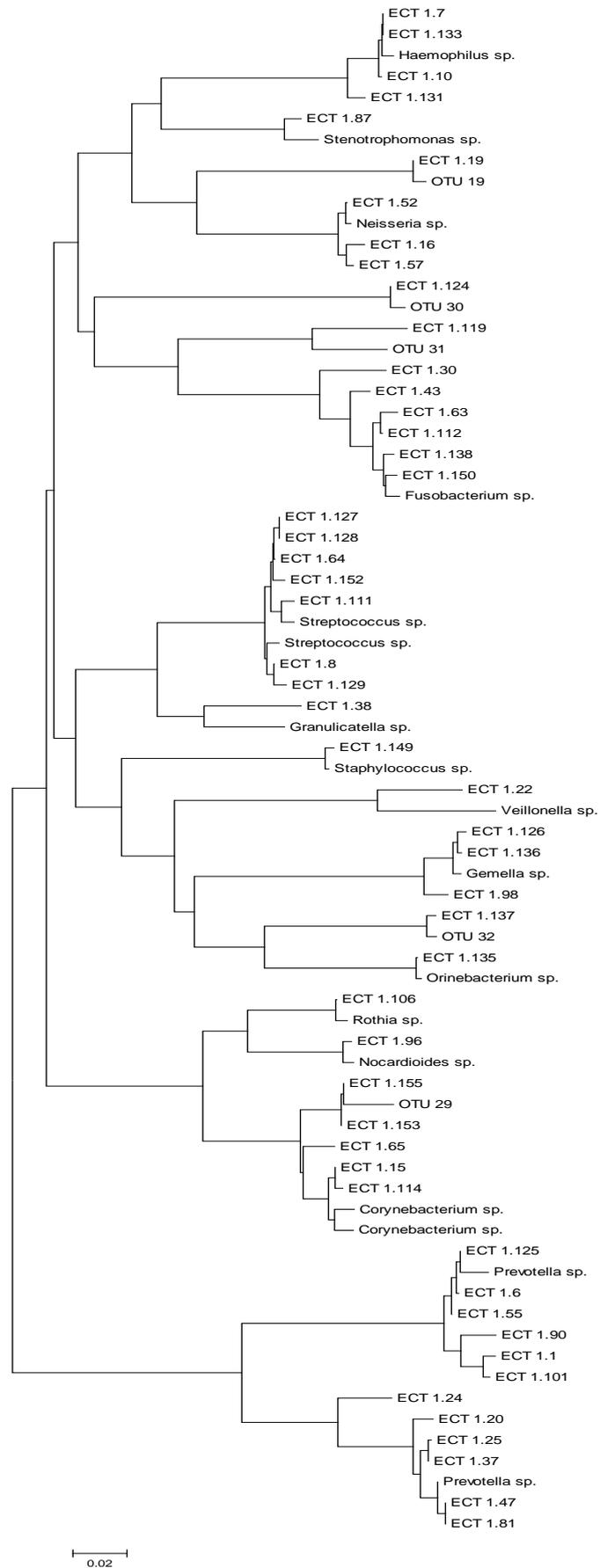
1.11. ANEXO 11: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>A</sub> 4



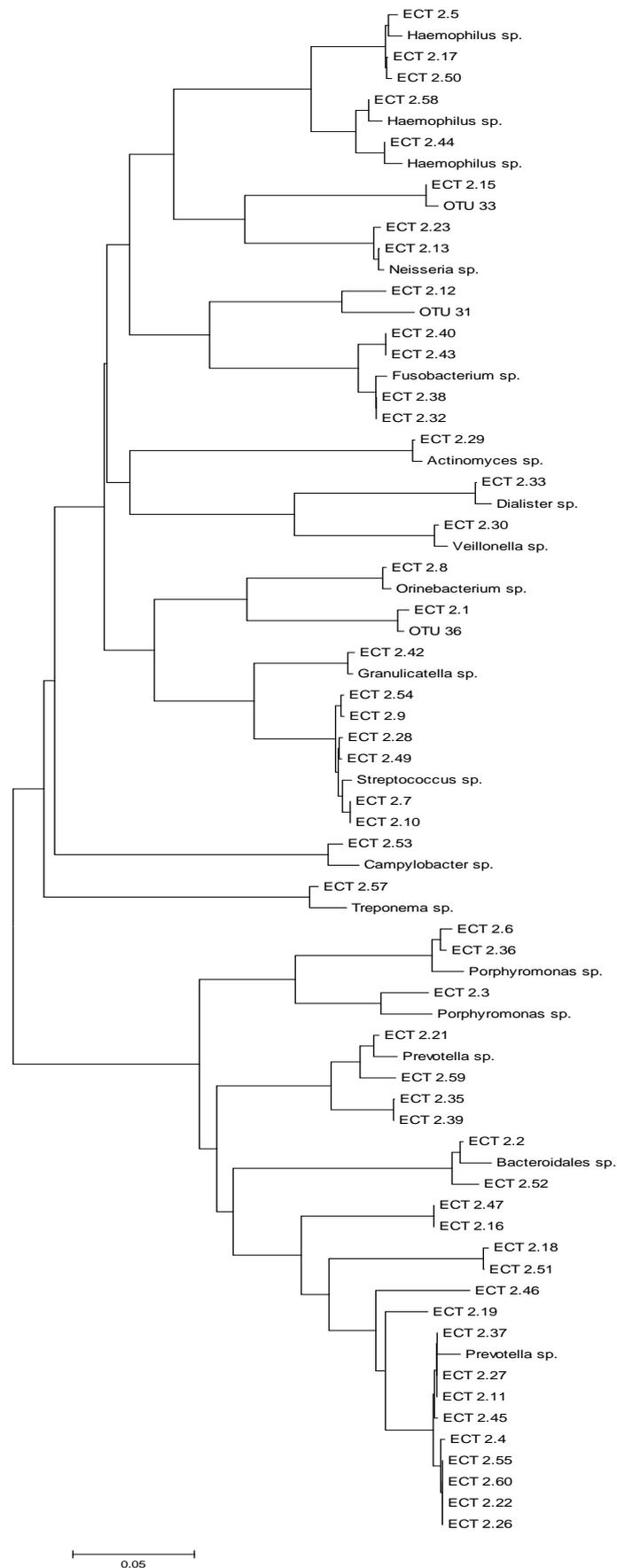
1.12. ANEXO 12: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>A</sub> 5



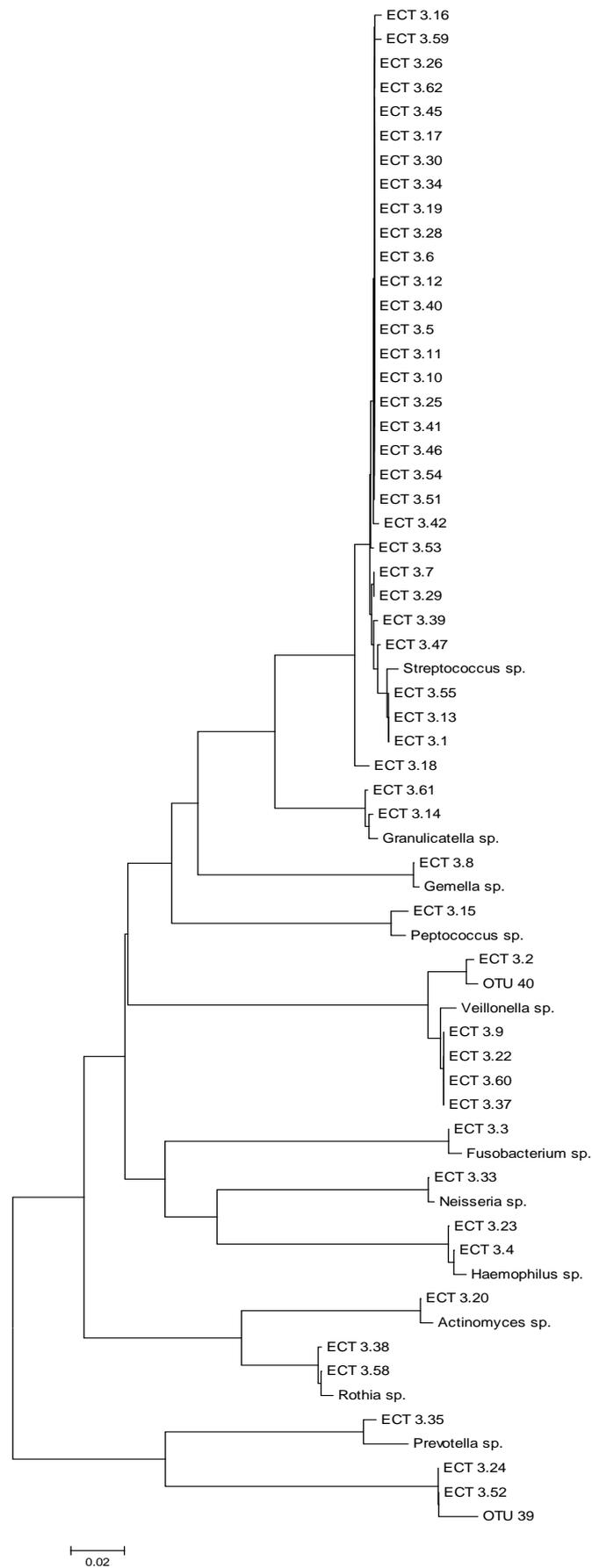
### 1.13. ANEXO 13: Árbol filogenético Paciente ECT<sub>A</sub> 1



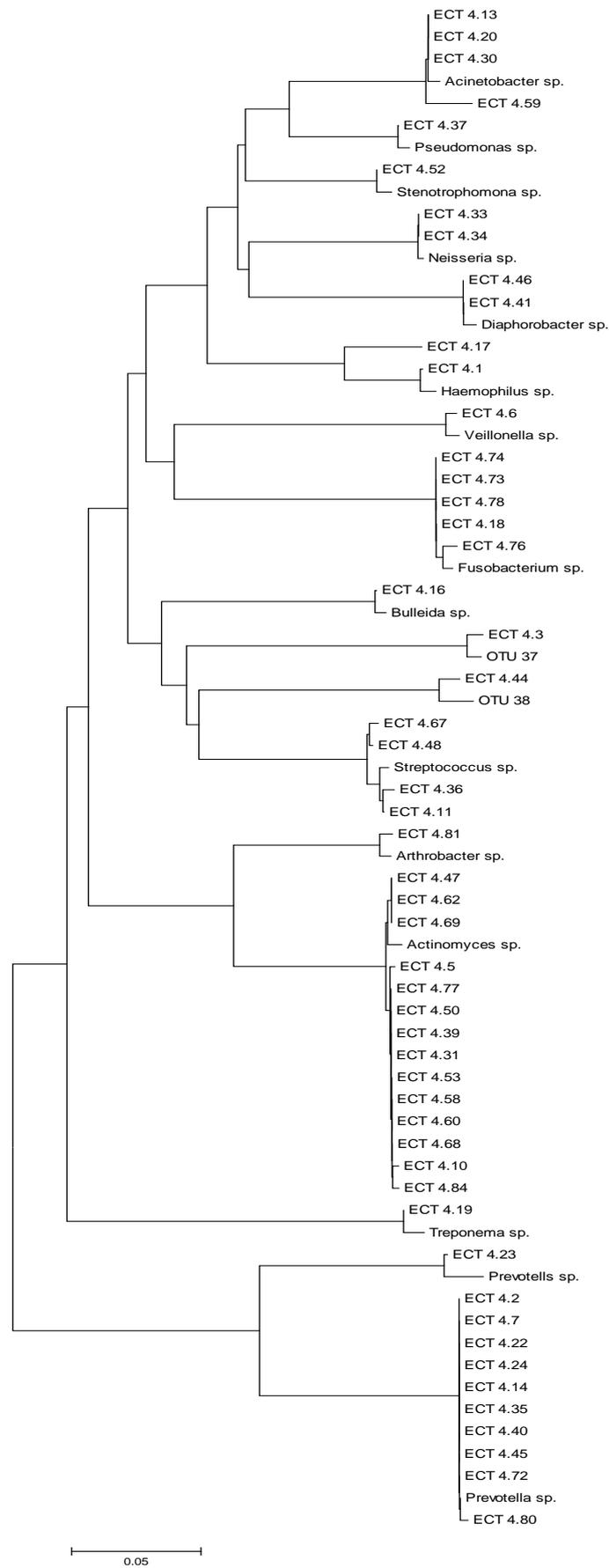
1.14. ANEXO 14: Árbol filogenético Paciente ECT<sub>A</sub> 2



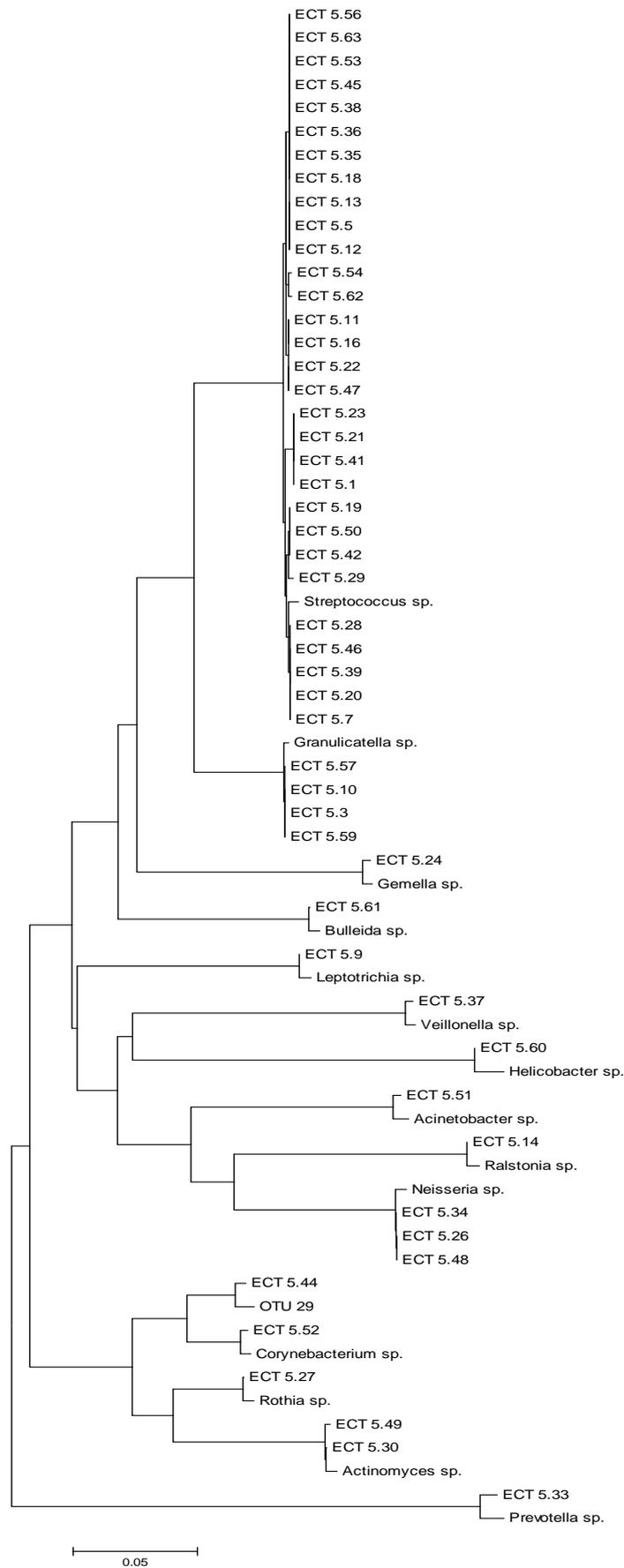
### 1.15. ANEXO 15: Árbol filogenético Paciente ECT<sub>A</sub> 3



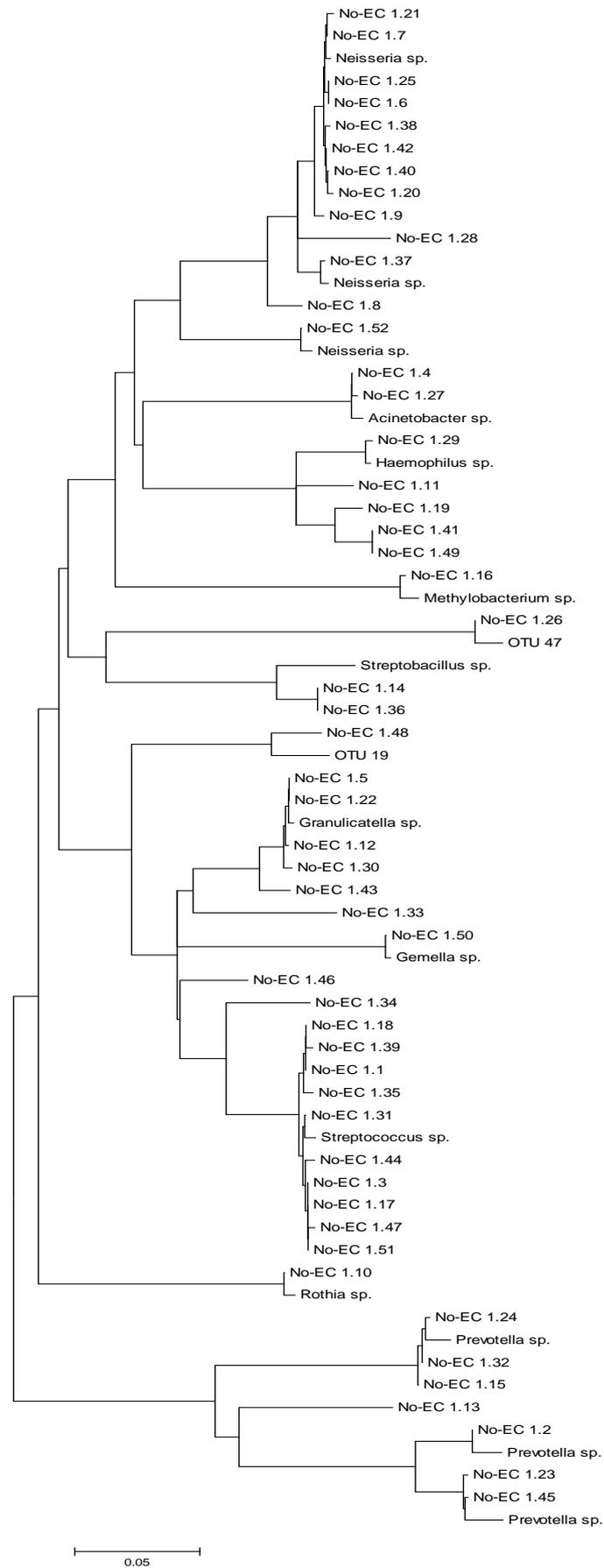
1.16. ANEXO 16: Árbol filogenético Paciente ECT<sub>A</sub> 4



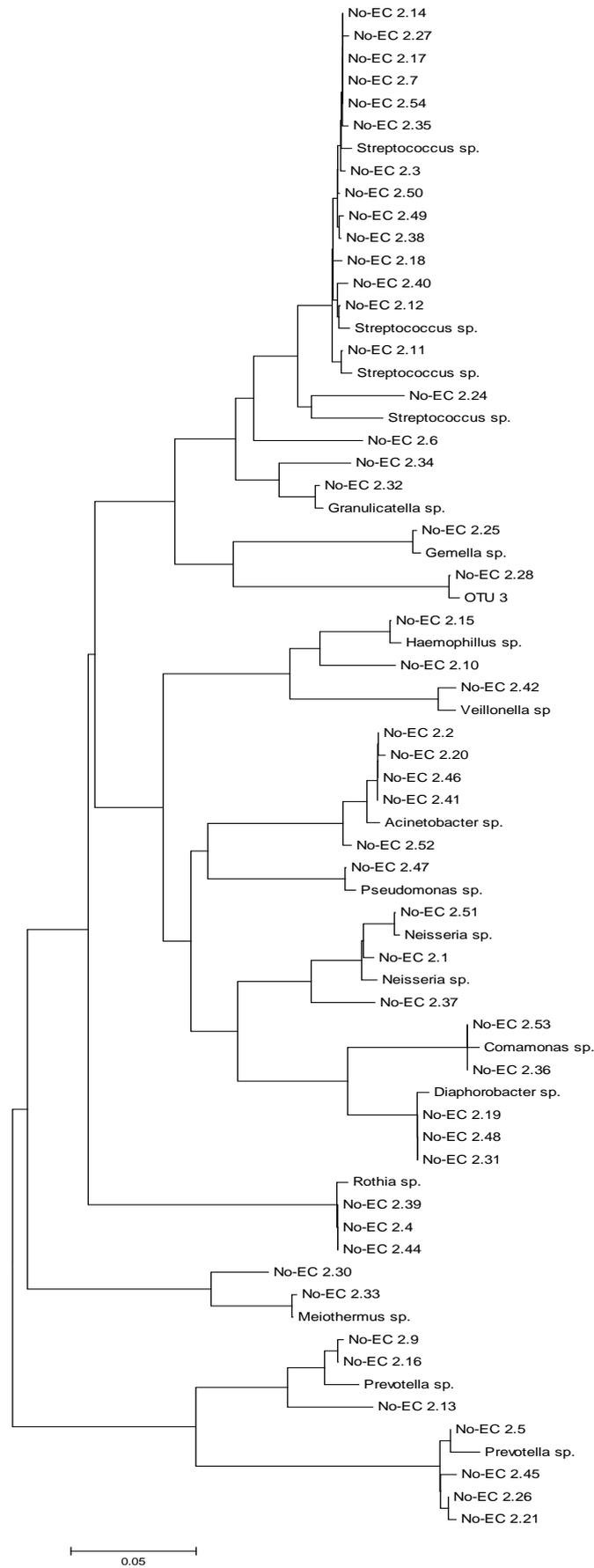
### 1.17. ANEXO 17: Árbol filogenético Paciente ECT<sub>A</sub> 5



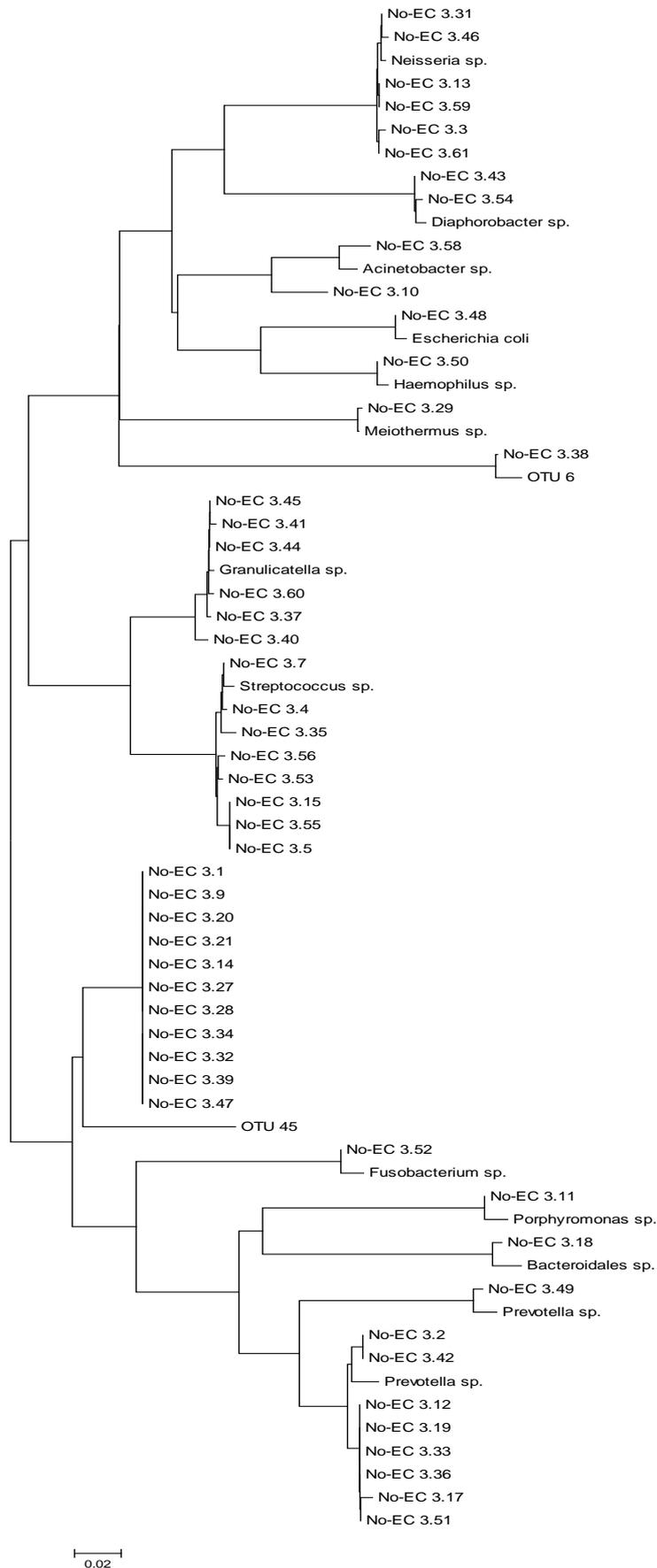
1.18. ANEXO 18: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>N</sub> 1



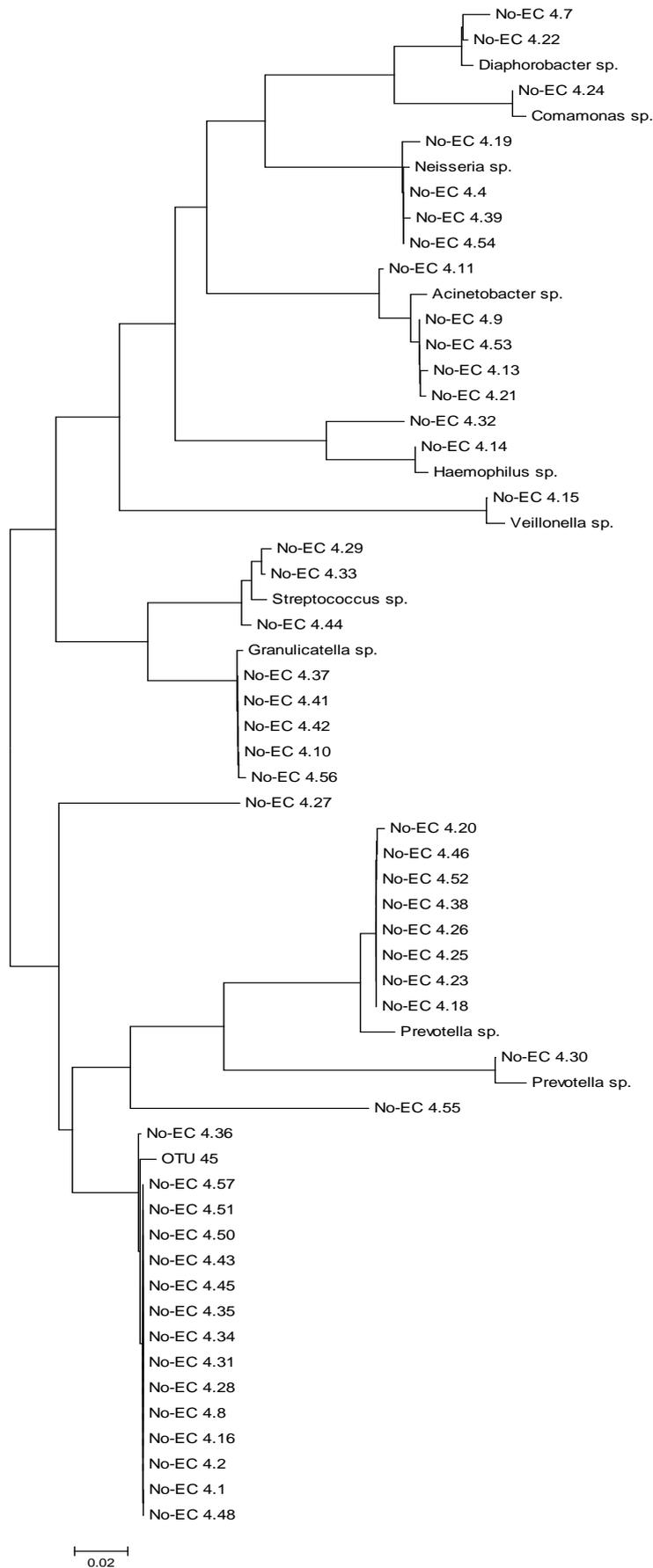
1.19. ANEXO 19: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>N</sub> 2



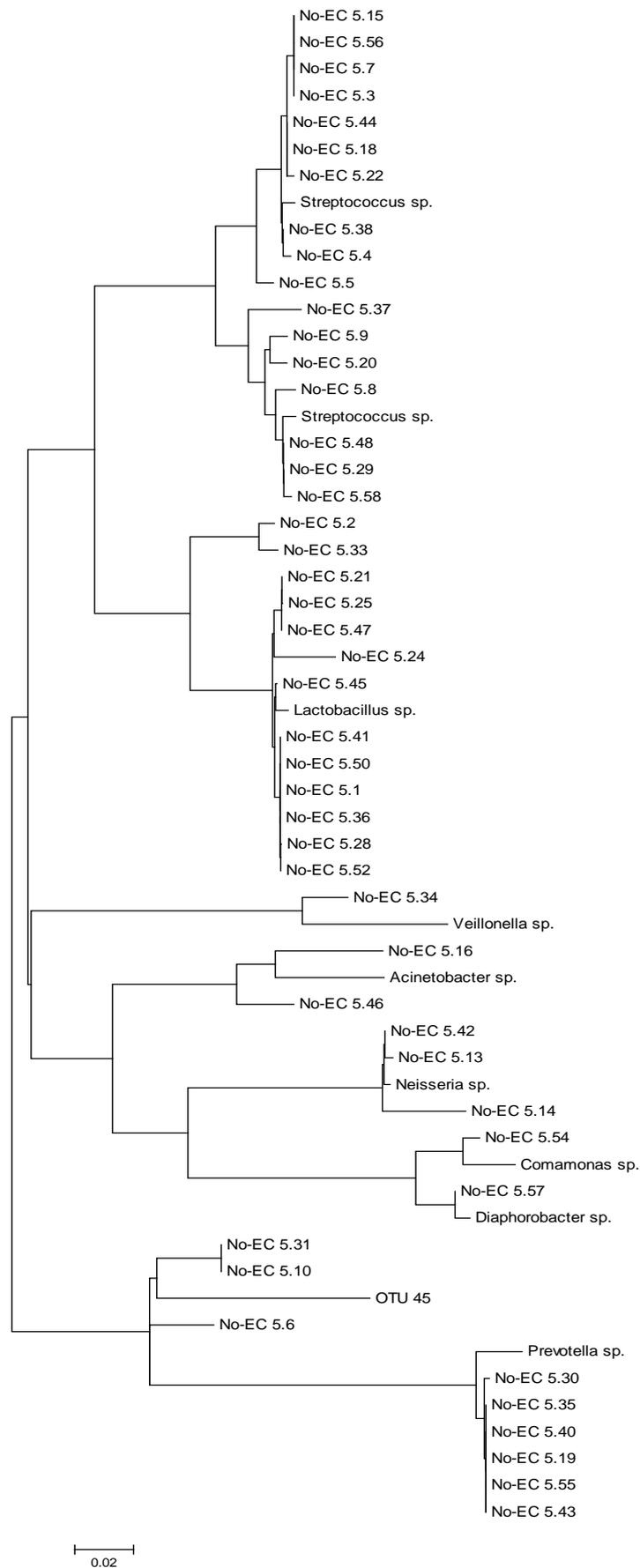
1.20. ANEXO 20: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>N</sub> 3



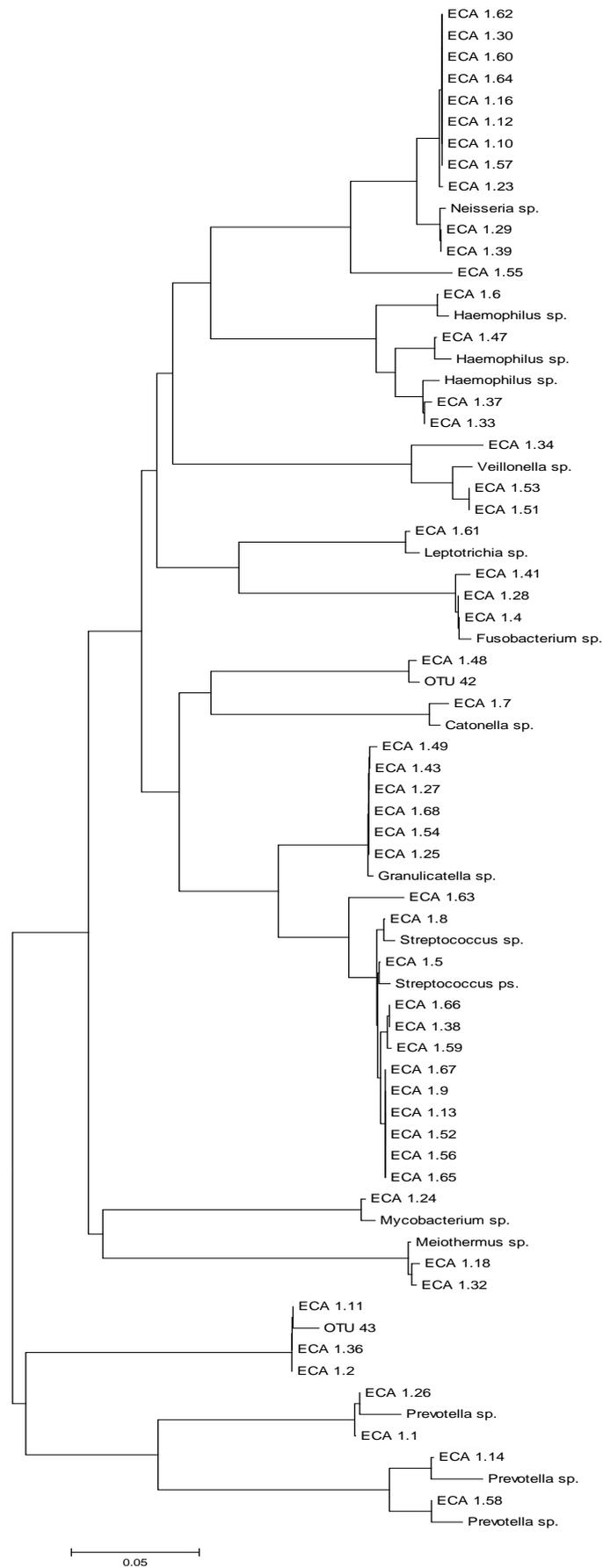
1.21. ANEXO 21: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>N</sub> 4



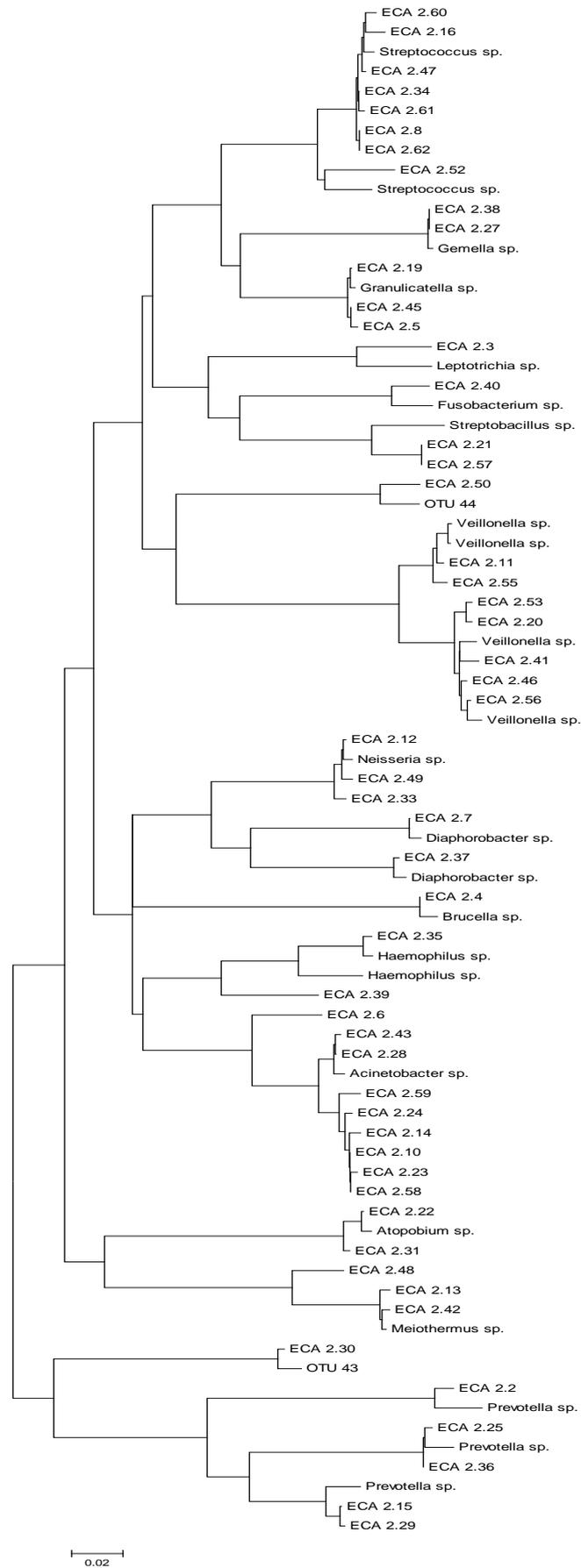
1.22. ANEXO 22: Árbol filogenético Paciente No-EC<sub>N</sub> 5



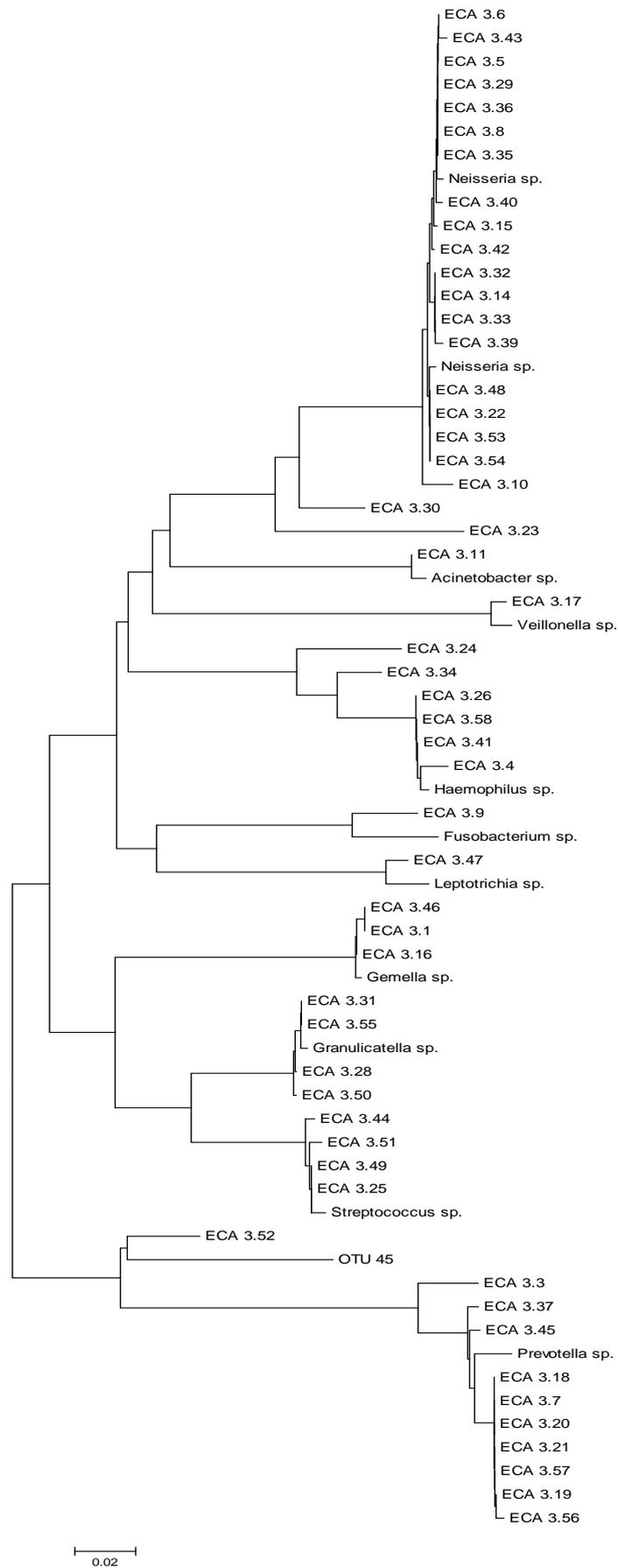
1.23. ANEXO 23: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 1



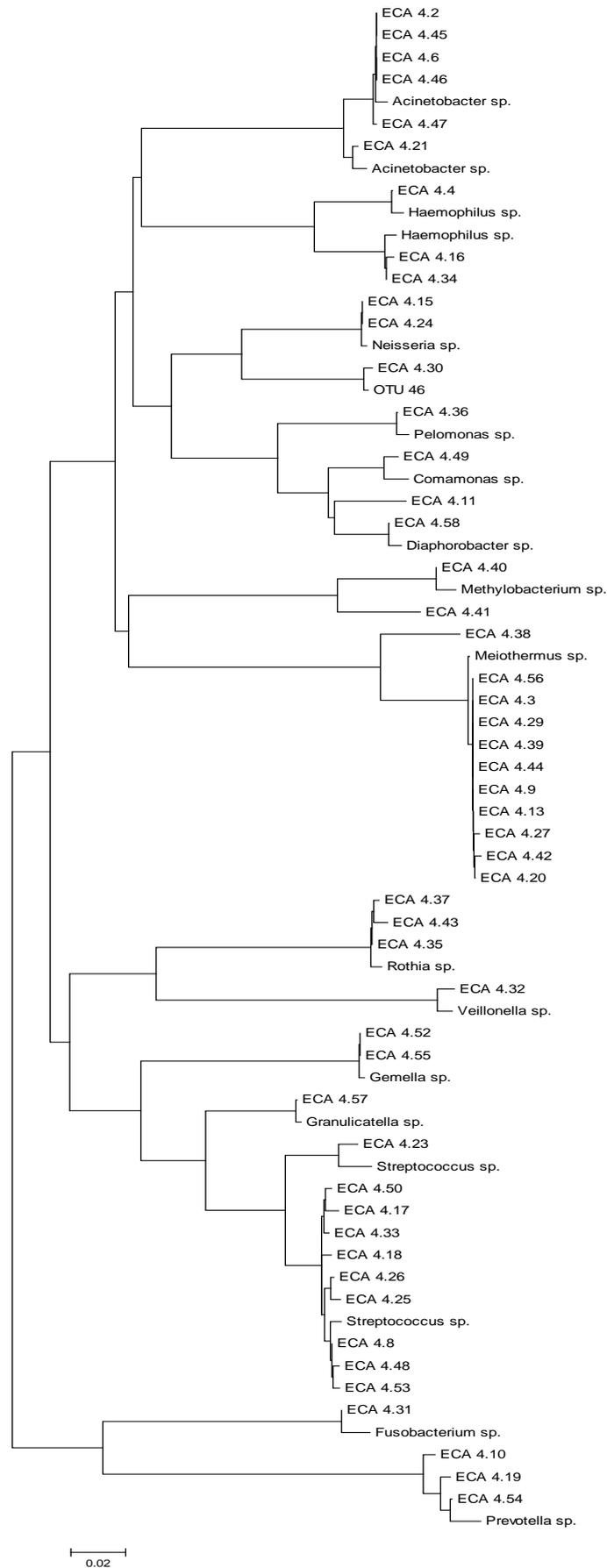
1.24. ANEXO 24: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 2



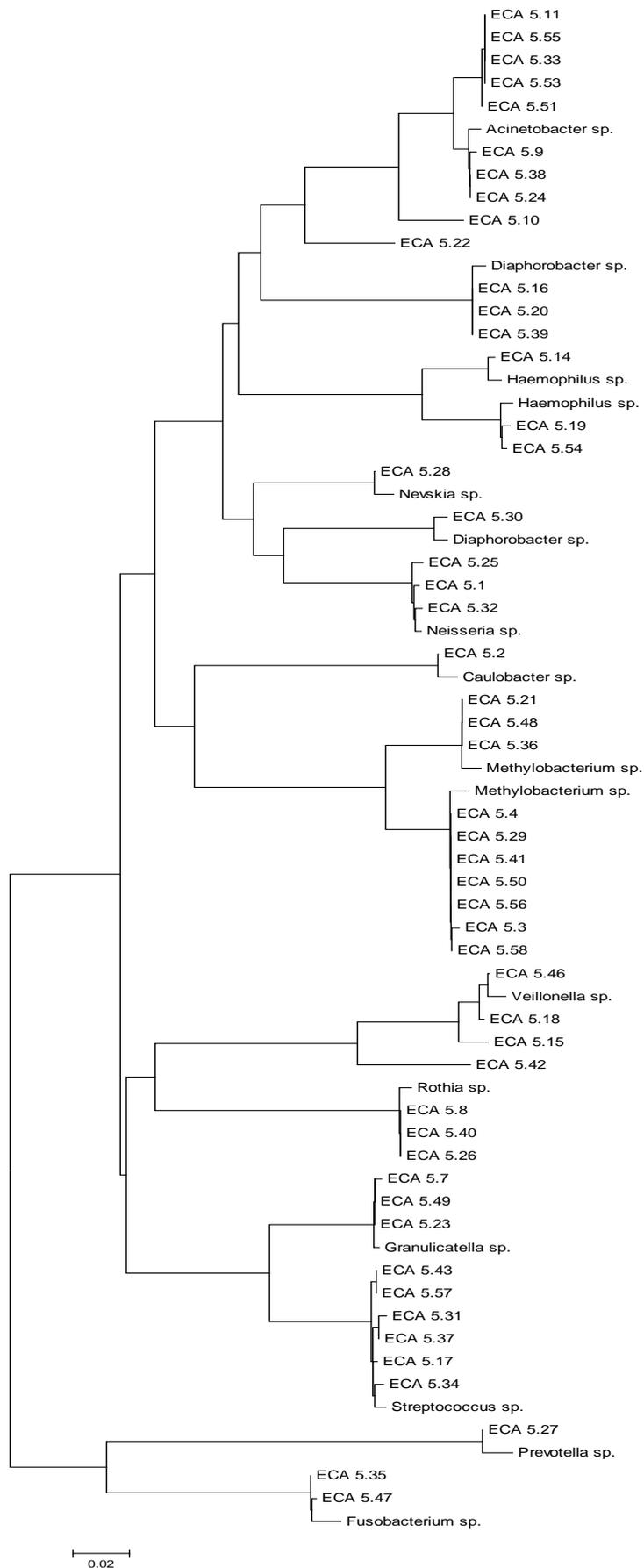
1.25. ANEXO 25: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 3



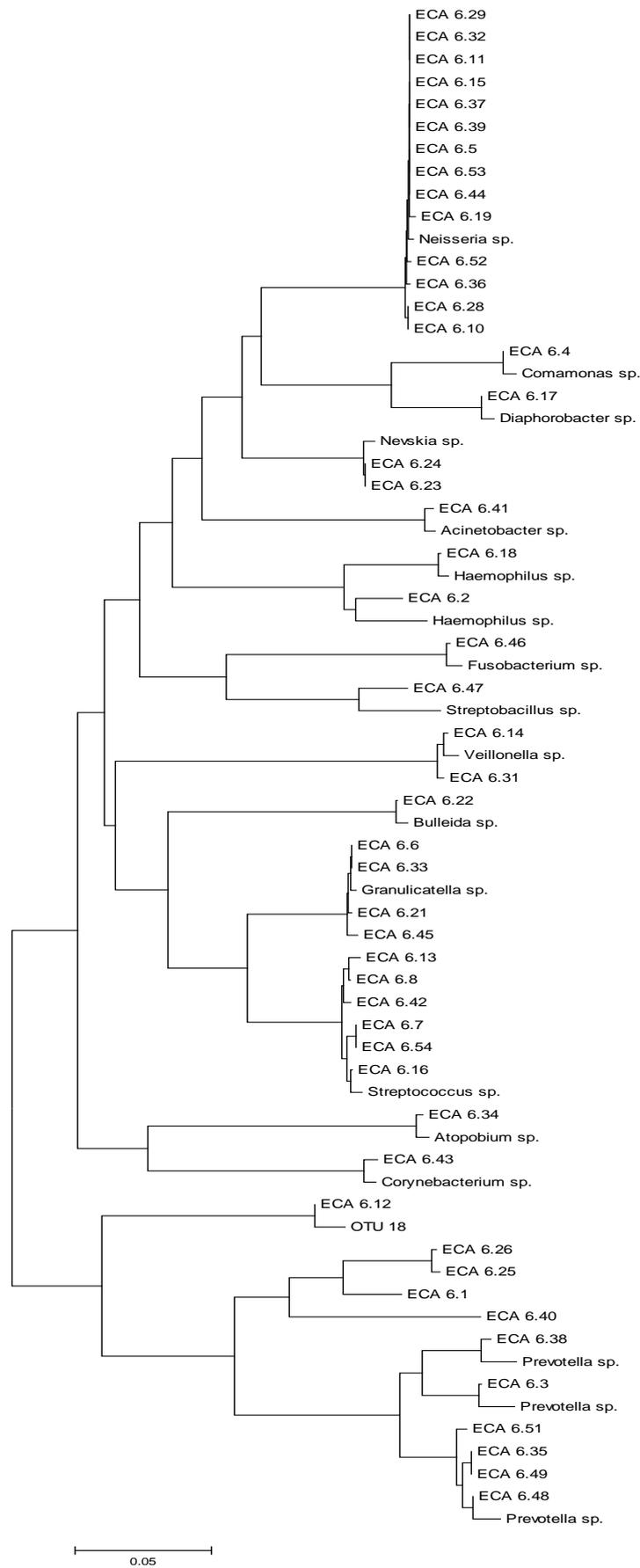
1.26. ANEXO 26: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 4



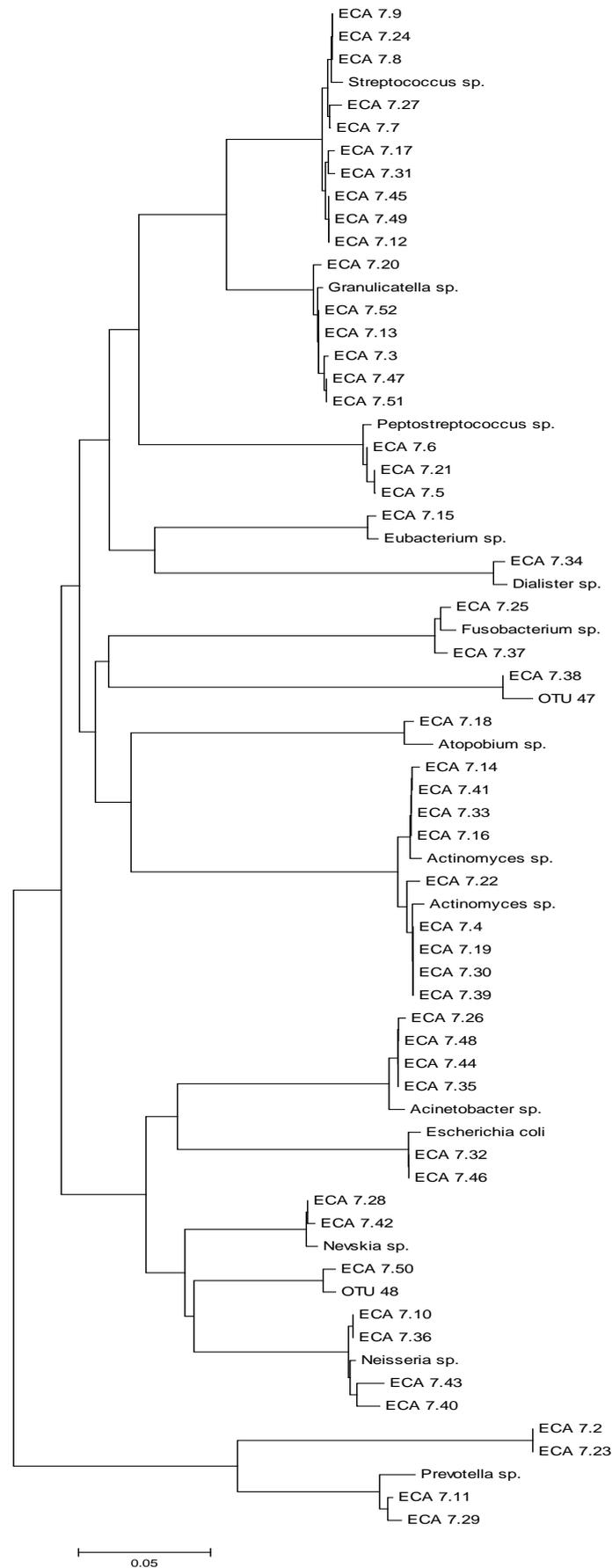
1.27. ANEXO 27: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 5



1.28. ANEXO 28: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 6



1.29. ANEXO 29: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 7



1.30. ANEXO 30: Árbol filogenético Paciente ECA<sub>N</sub> 8

