



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

Estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en humanos



Memoria presentada por el Licenciado Alberto Caminero Fernández para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de León

León, 2013



UNIVERSIDAD DE LEÓN

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

El Dr. D. FRANCISCO JAVIER CASQUEIRO BLANCO y el Dr. D. SANTIAGO VIVAS ALEGRE como directores de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en humanos" realizada por D. ALBERTO CAMINERO FERNÁNDEZ, en el programa de doctorado BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a ____ de mayo de 2013.

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. D. Francisco Javier Casqueiro Blanco

Fdo: Dr. D. Santiago Vivas Alegre



UNIVERSIDAD DE LEÓN

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y Norma 7ª de las Complementarias de

El órgano responsable del programa de doctorado de BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA en su reunión celebrada el día _____ de 2013 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en humanos”, dirigida por el Dr. D. Francisco Javier Casqueiro Blanco y el Dr. D. Santiago Vivas Alegre, y elaborada por D. Alberto Caminero Fernández, cuyo título en inglés es: “Study of the metabolic activity of the intestinal microbiota associated with gluten intake in humans”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a _____ de mayo de 2013.

VºBº

El Director del Departamento,

El secretario,

Fdo.: Dr. D. Arsenio Fernández López

Fdo.: Dr. D. Carlos Polanco de la Puente

A mi familia

*Quien tiene un porqué para vivir
Puede enfrentarse a todos los cómo*

Viktor Frankl

AGRADECIMIENTOS

Un trabajo como este sólo adquiere auténtico valor cuando permite agradecer a todas las personas que, de una manera u otra, han apoyado a su realización durante estos años. Muchas son las personas que han participado con su esfuerzo y su confianza en la elaboración de esta Tesis Doctoral. A ellas les quiero agradecer.

En primer lugar, al Dr. Javier Casqueiro Blanco, director de esta Tesis y principalmente amigo. Gracias por darme la primera oportunidad, la más difícil. Gracias por tus consejos, tus ideas y los Tés con limón los días de desamparo científico. Me guardo muchas de tus lecciones para mi futuro. Ha sido un placer haber descubierto el mundo de la celiaca de tu mano.

En segundo lugar quiero agradecer al Dr. Santiago Vivas, co-director de esta Tesis Doctoral, y a José María Ruiz de Morales, “tri-director de Tesis”, si se me permite el nuevo concepto. Ha sido muy grato para mí haber disfrutado de vuestra experiencia. Gracias por estar siempre disponibles y por vuestra ayuda constante.

A mis compañeras de laboratorio. A Esther por ser “mi becaria mayor”, dar conmigo los primeros pasos científicos y por ayudarme tanto. Quiero agradecer tu esfuerzo y amistad durante estos años, y darte la enhorabuena por tu nueva etapa en la vida. A Sandra, compi de laboratorio y hombro en el que llorar en mis eventuales fracasos experimentales. Siento haberte estropeado los bolis. Quiero que sepas, que no fui capaz de reemplazarte por la caja de cartón durante tu estancia. A Jenifer, la última integrante del grupo. Gracias por tu importante trabajo sucio en esta Tesis Doctoral durante mi ascenso a quasi-doctor. Creo que el futuro de mis bichos está en las mejores manos posibles. También quiero agradecer a otros actores secundarios como Ana, María, Lara, que ayudaron al trabajo experimental de esta Tesis.

Una mención muy especial, e importante para mí, va para Luis y Laura, mis compañeros médicos de Tesis. Gracias por las horas extras, las clases de estadística y por el trabajo tan importante que habéis hecho para que esta Tesis saliera adelante.

Al Dr. Leandro Aparicio y al Dr. Miguel Ángel Ferrero, por su ayuda e importante trabajo en la cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta, y a la Dra. Silvia Albillos por su colaboración en el uso del HPLC.

A todos mis amigos que de manera indirecta me habéis ayudado tanto. Gracias por los momentos inolvidables de estos años y por mostrarme que hay vida después de la

Tesis. Siento decir que en esta ocasión voy a faltar a mi palabra, y no voy a repetir locuras anteriores, como pintar el coche de rosa.

A Sarita, no se puede escribir con palabras lo importante que has sido para mí estos años. Gracias por todo tu apoyo, tu cariño y tu alegría. Gracias por hacerme tan feliz. Si algún día me tropiezo con Merlín le daré las gracias por haberte cruzado en mi camino.

Para finalizar, y no por eso menos importante, a mi familia. A mi hermana Almudena, directora de diseño gráfico de esta Tesis. Gracias por el trabajo invertido y por poner un poco de “arte” en la “ciencia”. A mis padres, por comprender lo incomprensible, apoyar siempre mis sueños y estar cuando nadie está. Sin vosotros esto no hubiera sido posible.

Muchas gracias a todos. Esta Tesis también es vuestra.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
1- El gluten.....	4
1.1- La importancia de los cultivos de trigo	4
1.2- ¿Qué es el gluten?	5
1.3- La toxicidad del gluten.....	10
2- La enfermedad celiaca	12
2.1- Concepto e historia de la enfermedad celiaca	12
2.2- Clínica y diagnóstico de la enfermedad celiaca	14
2.3 Patogénesis de la enfermedad celiaca	16
2.4- Tratamiento de la enfermedad celiaca.....	22
3- El metabolismo del gluten	26
3.1- Metabolismo de proteínas	26
3.2- ¿Qué conocemos del metabolismo del gluten?	31
3.3- Diferencias en el metabolismo del gluten entre sanos y pacientes con enfermedad celiaca.....	35
4- La microbiota intestinal.....	40
4.1- Composición y desarrollo de la microbiota intestinal	40
4.2- Funciones de la microbiota intestinal	43
4.3- Bacterias proteolíticas en el tracto digestivo: ¿Degradación microbiana del gluten?.....	46
4.4- Microbiota intestinal y la enfermedad celiaca	49
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1- Sujetos de estudio	61
2- Recogida y conservación de muestras	62
3- Cuantificación de actividades proteolíticas fecales	63

3.1-	Actividad trípica fecal (ATF)	63
3.2-	Actividad glutenásica fecal (AGF)	64
3.3-	Actividad prolilendopeptidásica fecal (PEPF)	64
3.4-	Actividad dipeptidil peptidásica IV (DPPIV)	65
4-	Cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	66
4.1-	Extracción de los AGCC	66
4.2-	Condiciones cromatográficas	67
5-	Estabilidad del péptido 33-mer en muestras fecales.....	67
5.1-	Incubación del péptido 33-mer con muestras fecales.....	68
5.2-	Condiciones cromatográficas	68
6-	Cultivo de muestras fecales en medios con gluten	69
6.1-	Cultivo de heces en medio líquido	70
6.2-	Cultivo de heces en medio sólido	70
6.3-	Medios de cultivo con gluten (MCG)	71
7-	Caracterización y mantenimiento de las cepas que participan en el metabolismo del gluten.....	72
7.1-	Mantenimiento de las cepas bacterianas aisladas	73
7.2-	Extracción de ADN genómico de cultivos bacterianos	73
7.3-	Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	75
7.4-	Ligación del fragmento en un vector	77
7.5-	Transformación del vector en <i>E.coli</i>	79
7.6-	Extracción ADN plasmídico de <i>E. coli</i> : Minipreparaciones	80
7.7-	Digestión del ADN con enzimas de restricción	81
7.8-	Purificación de ADN plasmídico para secuenciación.....	82
8-	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)	83
8.1-	Extracción de ADN	84
8.2-	Reacción de PCR-DGGE.....	84
8.3-	Elaboración de los geles de acrilamida del DGGE	86

8.4-	Electroforesis del ADN en DGGE	88
8.5-	Extracción de bandas para secuenciación	88
9-	Secuenciación y análisis de ADN.....	90
10-	Detección de gluten en heces y en medios con gluten	91
10.1-	Extracción del gluten de las muestras	92
10.2-	ELISA GlutenTox competitivo	93
11-	Análisis estadístico	94
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		97
1.	Estudio del metabolismo del gluten en individuos sanos	99
1.1-	Las actividades enzimáticas fecales se incrementan a medida que se ingiere gluten en la dieta	100
1.2-	Los ácidos grasos de cadena corta fecales aumentan cuando hay grandes ingestas de gluten en la dieta	105
1.3-	La cantidad de gluten que se detecta en las heces está relacionado con su consumo en la dieta	108
1.4-	La capacidad de las heces de digerir 33-mer es independiente de la dieta pero está relacionada con la AGF	110
1.5-	Discusión general.....	113
2.	Estudio comparado entre el metabolismo del gluten en individuos sanos y pacientes con enfermedad celiaca	117
2.1-	Aparecen diferencias significativas entre los distintos grupos analizados en las actividades glutenásica fecal y trípica fecal	117
2.2-	Los ácidos grasos de cadena corta son significativamente más abundantes en pacientes con enfermedad celiaca.....	122
2.3-	El contenido de gluten es menor en las heces de pacientes celíacos que en las heces de los voluntarios sanos	125
2.4-	Los sobrenadantes fecales de los pacientes celíacos también son capaces de hidrolizar el péptido 33-mer.....	128
2.5-	Discusión general.....	130
3.	Estudio del metabolismo del gluten en familiares de celíacos	135

3.1-	Sólo se detectan diferencias significativas en la actividad glutenásica fecal entre las distintas dietas llevadas a cabo por los familiares	136
3.2-	Aparecen diferencias significativas entre familiares y enfermos celíacos en las actividades trípica fecal y glutenásica fecal	138
3.3-	Los ácidos grasos de cadena corta aumentan con la ingesta de gluten en la dieta.....	141
3.4-	La concentración de ácidos grasos de cadena corta es menor en sanos que en familiares y pacientes celíacos.....	144
3.5-	Las heces de familiares presentan una concentración menor de gluten que las muestras fecales de sanos y mayor que las muestras de celíacos	148
3.6-	Hay correlación entre la AGF y la actividad peptidásica frente al 33-mer de las muestras fecales	151
3.7-	Discusión general.....	153
4.	Identificación y caracterización de la microbiota fecal implicada en el metabolismo del gluten en sanos, celíacos y familiares de celíacos.....	157
4.1-	Las muestras fecales presentan una mayor actividad proteolítica en el MCG-3.....	158
4.2-	No aparecen diferencias en el consumo de gluten en los cultivos fecales en MCG-3 en función del diagnóstico	159
4.3-	Las muestras fecales presentan múltiples bacterias proteolíticas que pueden participar en el metabolismo del gluten.....	159
4.4-	Muchas cepas presentaron actividad proteolítica frente al gluten y frente a la gelatina.....	165
4.5-	Estudio molecular mediante PCR-DGGE de la microbiota que se desarrolla en el medio de cultivo líquido MCG-3.....	167
4.6-	Discusión general.....	172
CONCLUSIONES.....		177
BIBLIOGRAFÍA.....		181
ANEXOS.....		197

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Comparación de la arquitectura vellositaria en la biopsia duodenal de un individuo sano y un paciente con enfermedad celiaca.....	15
Figura 2: Modelo de iceberg para explicar las diferentes formas clínicas de la enfermedad celiaca..	16
Figura 3: Modelo inmunopatológico de la enfermedad celiaca.....	19
Figura 4: Modelo esquemático de los procesos de digestión y absorción en el tracto gastrointestinal..	30
Figura 5: Modelo esquemático comparado entre el metabolismo de proteínas fácilmente digeribles y proteínas del gluten..	35
Figura 6: Modelo hipotético del metabolismo del gluten en pacientes celiacos..	39

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 7: Ciclos que se llevaron a cabo en el termociclador para realizar la PCR de una región de ADN de 900 pb codificante de ARNr 16S.	76
Figura 8: Mecanismo de acción del <i>StrataClone PCR cloning</i> (Stratagene)	78
Figura 9: Esquema del fundamento de la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE).....	84
Figura 10: Ciclos que se llevaron a cabo en el termociclador para realizar la PCR-DGGE.....	86
Figura 11: Ciclos que se llevaron a cabo en el termociclador para realizar la PCR de una región de ADN de 200 pb .codificante de ARNr 16S	89
Figura 12: Esquema del fundamento de ELISA competitivo.	92

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 1.1: Esquema de la dieta llevada a cabo por los 11 voluntarios sanos.....	100
Figura 1.2: Valores medios obtenidos de ATF, AGF, PEPF y DPPIV fecal en la población de 11 voluntarios sanos..	101
Figura 1.3: Valores medios de concentración de AGCC totales en las muestras fecales de 11 voluntarios sanos en las distintas dietas.....	107
Figura 1.4: Valores medios obtenidos de la cuantificación del gluten fecal de 11 voluntarios sanos en las distintas dietas..	109
Figura 1.5: Cromatogramas de cuatro muestras fecales en DN incubadas con el péptido 33-mer a distintos tiempos (2h, 6h, 8h y 12 h).	111

Figura 1.6: A, Correlación entre los valores obtenidos de AGF con los obtenidos de actividad peptidásica frente al 33-mer. B, Diagrama sectorial del porcentaje de muestras fecales con actividad proteolítica frente al 33-mer para los diferentes tiempos de incubación. 112

Figura 2.1: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de las actividades enzimáticas analizadas en las muestras de voluntarios sanos en DN, voluntarios sanos en DSG, pacientes celíacos en DN y pacientes celíacos en DSG.. 118

Figura 2.2: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de la concentración de AGCC en las muestras fecales de sanos en DN, sanos en DSG, celíacos DN y celíacos en DSG..... 124

Figura 2.3: Valores de mediana, rangos e intercuartiles del gluten fecal cuantificado en las muestras de sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN y celíacos en DSG. 126

Figura 2.4: A, Esquema en el que está representado el tiempo necesario para la degradación del 33-mer por parte de las heces de sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN y celíacos en DSG. B, Correlación entre los valores obtenidos de AGF con la actividad degradadora de 33-mer con respecto al tiempo en sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN y celíacos en DSG. 129

Figura 3.1: Esquema de la dieta llevada a cabo por los familiares de pacientes celíacos durante 2 meses..... 136

Figura 3.2: Valores medios obtenidos de ATF, AGF, PEPF y DPPIVF en familiares DQ+ y familiares DQ- en DN, DSG y DN+15g gluten. 138

Figura 3.3: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de las actividades enzimáticas analizadas en las muestras de sanos en DN, celíacos en DN, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN..... 139

Figura 3.4: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de las actividades enzimáticas analizadas en las muestras de sanos en DSG, celíacos en DSG, familiares DQ+ en DSG y familiares DQ- en DSG..... 140

Figura 3.5: Valores medios obtenidos de concentración de AGCC en familiares DQ+ y familiares DQ- en DN, DSG y DN+15g gluten/día.. 143

Figura 3.6: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de concentración de los AGCC en las muestras fecales de sanos, celíacos, familiares DQ+ y familiares DQ- en DN y en DSG.. 148

Figura 3.7: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de la concentración de gluten en las heces de sanos en DN, celíacos activos, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN 149

Figura 3.8: A, Esquema en el que está representado el tiempo necesario para la degradación del 33-mer por parte de las heces de sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN, celíacos en DSG, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DSG B, Correlación entre los valores obtenidos de AGF y la actividad peptidásica frente al 33-mer en sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN, celíacos en DSG, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN..... 152

Figura 4.1: Esquema general del procedimiento llevado a cabo en el Capítulo 4.....	157
Figura 4.2: Diagrama sectorial mostrando la diversidad microbiana a nivel de género que se desarrolla en cada uno de los medios con gluten empleados: MCG-1, MCG-2 y MCG-3.	161
Figura 4.3: Colonias con actividad proteolítica frente a las proteínas del gluten.....	165
Figura 4.4: Dendograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos del DGGE para las muestras fecales de 7 voluntarios sanos, 5 celíacos activos, 7 familiares DQ+ y 3 familiares DQ- cultivadas en MCG-3.	168
Figura 4.5: Bandas del DGGE que fueron identificadas.	169

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Características de las proteínas del gluten..	6
Tabla 2: Clasificación de las prolaminas de trigo, cebada y centeno.....	9
Tabla 3: Microorganismos autóctonos del tracto digestivo y microorganismos capaces de participar en el metabolismo del gluten.....	49

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4: Descripción de los tres medios con gluten (MCG) utilizados en el cultivo de muestras fecales	71
Tabla 5: Descripción de los oligonucleótidos empleados para el ensayo de PCR.	75
Tabla 6: Componentes y concentraciones para la reacción de PCR en un volumen final de 25 µl empleando la enzima <i>rTaq</i> polimerasa.	75
Tabla 7: Cebadores empleados para las reacciones de PCR-DGGE.....	85
Tabla 8: Componentes y concentraciones para la reacción de PCR-DGGE en un volumen final de 25 µL empleando la enzima <i>rTaq</i> polimerasa.	85
Tabla 9: Volumen y cantidad de formamida y urea que es necesario añadir para soluciones desnaturizantes menores del 100%.	87
Tabla 10: Componentes empleados en la elaboración de las soluciones desnaturizantes	87
Tabla 11: Componentes y concentraciones para la reacción de PCR en un volumen final de 25 µL empleando la enzima <i>rTaq</i> polimerasa.	89

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1.1: Valores medios de concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en las muestras fecales de 11 voluntarios sanos en las distintas dietas de estudio.	106
Tabla 2.1: Valores medios de las concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en las muestras fecales de 16 sanos en DN, 11 sanos en DSG, 22 celíacos en DN y 18 celíacos en DSG.....	123
Tabla 3.1: Valores medios de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en muestras fecales correspondientes a 50 familiares DQ+ y 13 familiares DQ-.en las diferentes dietas analizadas.....	142

Tabla 3.2: Valores medios de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en muestras fecales correspondientes a 16 sanos en DN, 22 celíacos en DN, 58 familiares DQ+ en DN y 13 familiares DQ- en DN.	145
Tabla 3.3: Valores medios de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en muestras fecales correspondientes a 11 sanos en DSG, 18 celíacos en DSG, 57 familiares DQ+ en DSG y 13 familiares DQ- en DSG.	146
Tabla 4.1: Estudio del consumo de gluten en los cultivos de 7 muestras fecales de voluntarios sanos en MCG-1, MCG-2 y MCG-3.	158
Tabla 4.2: Estudio del consumo de gluten en los cultivos de muestras fecales en MCG3 de: 7 sanos, 5 celíacos activos y 10 familiares en dieta normal.	159
Tabla 4.3: Microorganismos aislados tras el cultivo de las muestras fecales de 7 voluntarios sanos, 5 celíacos activos y 10 familiares de pacientes celíacos en tres medios de cultivo diferentes: MCG-1, MCG-2 y MCG-3.	164
Tabla 4.4: Actividades proteolíticas de las cepas bacterianas seleccionadas de los Medios MCG-1, MCG-2 y MCG-3.	166
Tabla 4.5: Frecuencia de bacterias detectadas mediante PCR- DGGE en muestras fecales de individuos sanos, celíacos y familiares de pacientes celíacos.	170

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGF	Actividad glutenásica fecal
AMN	Aminopeptidasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATF	Actividad trípica fecal
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
CPA	Célula presentadora de antígeno
DCP1	Dipeptidil carboxipeptidasa 1
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Dieta Normal
DN+15g	Dieta Normal con suplemento de 15 g de gluten al día
dNTPs	desoxi nucleótidos
DPPIV	Dipeptidil peptidasa IV
DPPIVF	Dipeptidil peptidasa IV fecal
DSG	Dieta Sin Gluten
DSG+9g	Dieta Sin Gluten con suplemento de 9 g de gluten al día
DSG+30g	Dieta Sin Gluten con suplemento de 30 g de gluten al día
EC	Enfermedad celiaca
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
GAPM	Gliadinas de alto peso molecular
GLBPM	Gluteninas de bajo peso molecular
GLAPM	Gluteninas de alto peso molecular
HLA	Antígeno leucocitario humano
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Ig	Inmunoglobulina
IFN	Interferón
MCG	Medio con gluten
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEP	Proilendopeptidasa
PEPF	Proilendopeptidasa fecal
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>

TAE	Tris acetato EDTA
TB	<i>Terrific broth</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TG2	Transglutaminasa tisular 2
TJs	<i>Tightjunctions</i>
Tm	Temperatura de melting o de fusión
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TGGE	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arimethic mean</i>
X-Gal	5-bromo-4cloro-3indolil- β -galactopiranósido

INTRODUCCIÓN

Hoy en día es frecuente relacionar el gluten con ciertos alimentos, así como con determinados enfermos que se ven afectados tras su ingesta, pero ¿Qué es realmente el gluten? ¿Cuál es el motivo por el que los alimentos con gluten no pueden ser consumidos por muchas personas? ¿Por qué es dañino para algunos individuos y para otros no? En esta Tesis Doctoral vamos a intentar dar respuesta a todas estas preguntas, haciendo hincapié en el proceso metabólico del gluten en el tracto digestivo humano. Para hacer un pequeño acercamiento a su definición podemos decir que el gluten forma parte del componente proteico de reserva que aparece en el endospermo de algunos cereales. Este es el responsable de las propiedades de elasticidad, cohesión y viscosidad que posee la harina de trigo. Son precisamente estas propiedades fisicoquímicas las que hacen que el trigo posea unas características únicas que no se encuentran en ningún otro cereal y que son importantes a nivel culinario, permitiendo la elaboración de pan y otros alimentos procesados como las pastas, galletas, etc. Por esta razón el gluten se encuentra presente en numerosos alimentos y su eliminación de la dieta es realmente complicada. A su vez, el gluten es el protagonista negativo de una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes en la actualidad: la enfermedad celiaca. Hoy en día, el único tratamiento de esta enfermedad es llevar a cabo una dieta sin gluten de por vida con todos los problemas que ello conlleva. Dada la importancia y ubicuidad del gluten en la actualidad, parece sorprendente el escaso conocimiento que hay sobre su metabolismo en el cuerpo humano, más aun cuando se sabe que este componente tiene un efecto perjudicial sobre determinados individuos. Por esta razón, el objetivo de esta Tesis Doctoral es estudiar el metabolismo del gluten en individuos sanos, enfermos celiacos y familiares de pacientes celiacos; centrándonos principalmente en el metabolismo microbiano intestinal.

1- El gluten

1.1- La importancia de los cultivos de trigo

Los cereales son los cultivos más importantes a nivel mundial con unos 2.000 millones de toneladas de grano anuales. Sin embargo, el 70% de los cereales consumidos por la población mundial son el trigo, el maíz y el arroz (1). Por tanto, el trigo es uno de los cultivos más extendidos en la actualidad, cosechándose alrededor de unos 600 millones de toneladas repartidos en un área geográfica extensa (2). El trigo o triticum que conocemos hoy en día proviene de una hibridación del trigo silvestre que dio lugar a una planta hexaploide con unas semillas de mayor tamaño que las de su predecesora (3). El cultivo de esta planta perteneciente a la familia de las gramíneas se remonta a la antigua Mesopotamia, alrededor del 8500 a.C., y su recolección llevó consigo uno de los grandes avances del ser humano: la agricultura. La agricultura y la ganadería supusieron un profundo cambio en los hábitos sociales humanos con la aparición del sedentarismo y marcó la entrada del neolítico (3, 4). Desde entonces este cereal se ha extendido por casi todo el globo gracias principalmente a que la harina de trigo es la base del pan, tal vez el alimento más antiguo y distribuido en todas las culturas (3). La capacidad de la harina de trigo de producir pan se debe principalmente a las proteínas del gluten que proporcionan una masa elástica y cohesiva capaz de retener el gas producto de la fermentación de levaduras (5). Esta capacidad de formar masa es única, por esta razón el trigo, o más concretamente el gluten, se extendió a otras formulaciones alimentarias apareciendo de manera ubicua en la actualidad (6). La mayor parte se emplea para consumo humano, principalmente en productos horneados como pan o galletas; aunque también aparece en pastas, espesantes de salsas o incluso como aditivo de bebidas alcohólicas. Un porcentaje menor es destinado para el consumo animal, como simiente, o para uso industrial (2, 3). Por tanto, las características únicas del trigo se deben principalmente a las proteínas del gluten, que son las que convierten a la harina de trigo en uno de los alimentos más consumidos en todo el mundo. Se estima que la ingestión de gluten en un individuo que sigue una dieta occidental es de 10-20 g al día que es una cantidad muy elevada (7). Parece impensable que un alimento tan consumido y extendido a nivel mundial pueda acarrear un perjuicio en la salud. Sin embargo, no todo en el trigo son beneficios. Las proteínas del gluten, precisamente las

que hacen del trigo un cereal único e insustituible, tienen un efecto nocivo para determinados individuos (6).

1.2- ¿Qué es el gluten?

El gluten, estrictamente hablando, se puede definir como la masa que queda tras eliminar los componentes solubles en agua de la harina de trigo. Este sólido resultante contendrá, dependiendo de la intensidad de lavado, entre un 75-85% de proteínas y entre un 5-15% de lípidos y carbohidratos insolubles. Sin embargo, cuando comúnmente hablamos de gluten, nos referimos a las proteínas de reserva del trigo que son insolubles en agua (8). Desde un punto de vista fisiológico, las proteínas del gluten se encuentran en el endospermo del grano de trigo y su función es la de almacenar el carbono, nitrógeno y azufre necesarios para la germinación de la planta (8). No obstante, la importancia que ha adquirido el gluten en la actualidad no tiene nada que ver con las funciones de reserva que ejerce en la planta, sino con las propiedades visco elásticas de sus proteínas que le dan unas características únicas a nivel culinario e industrial (6).

El estudio de las proteínas presentes en los cereales, y más concretamente en el grano de trigo, comienza con el aislamiento del gluten por Beccari *et al.* en 1745 (1). Desde entonces se han llevado numerosas clasificaciones de su complejo entramado proteico. Una de las clasificaciones más utilizadas es la realizada por Osborne *et al.*, en 1924, en la que las proteínas presentes en las plantas se separaban en función de su solubilidad. Según esta clasificación las proteínas del grano de trigo se podían dividir en albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), gliadinas (solubles en solventes alcohólicos como etanol al 60%) y gluteninas (aquellas proteínas que sólo eran solubles en ácidos, bases, detergentes, etc.) (1, 9). La fracción correspondiente al gluten es la formada por los dos últimos componentes, es decir, gliadinas y gluteninas. A su vez las gliadinas y gluteninas están formados por una compleja mezcla de proteínas, que se pueden separar en más de 50 componentes individuales mediante técnicas de electroforesis en 2D. Ambos tipos de proteínas tienen una contribución importante en las propiedades reológicas de la masa. Sin embargo sus funciones son divergentes (8).

- **Las gliadinas**

Las gliadinas son proteínas monoméricas solubles en etanol al 60%. Éstas contribuyen principalmente a la viscosidad y extensibilidad de la masa y se pueden clasificar, según su movilidad electroforética a bajo pH, en: α/β -gliadinas, γ -gliadinas y ω -gliadinas (8). Las ω -gliadinas, también conocidas como gliadinas pobres en azufre, se caracterizan por tener un peso molecular mayor (40-50 kDa) y presentar casi en su totalidad regiones repetitivas ricas en glutamina y prolina tales como PQQPFPQQ. En cambio, las α/β -gliadinas y γ -gliadinas tienen menor peso molecular (28-35 kDa) y menor contenido de prolina y glutamina con respecto a las ω -gliadinas. Además, poseen cisteína en su secuencia aminoacídica que les permite formar enlaces disulfuro (8, 10) (Tabla 1). La diferencia entre α/β -gliadinas y γ -gliadinas radica en el contenido de algunos aminoácidos como la tirosina y en la presencia de diferentes dominios C-terminal y N-terminal (8). El dominio N-terminal se caracteriza por la aparición de regiones repetitivas ricas en glutamina, prolina, fenilalanina y tirosina. Las regiones repetitivas de las α/β -gliadinas son dodecapéptidos tales como QPQPFPQQPYP que se repiten normalmente cinco veces. En cambio la región N-terminal de las γ -gliadinas se caracterizan por la repetición de la secuencia QPQPFP, con residuos adicionales intercalados, al menos unas 16 veces (11). Por otro lado, la región C-terminal no tiene regiones repetitivas y presenta una proporción menor de residuos de prolina y glutamina que el dominio N-terminal. Aunque este dominio es homólogo en α/β -gliadinas y γ -gliadinas, va a haber menos residuos de cisteína en las α/β -gliadinas que va a afectar a su capacidad de formar uniones intracadena (8, 11, 12).

Tabla 1: Características de las proteínas del gluten. Se muestra el peso molecular de las proteínas (Pm) en kilodaltons (kDa), el porcentaje de cada proteína de acuerdo al total de proteína presente en el gluten y la composición en los aminoácidos glutamina (Gln), prolina (Pro), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y glicina (Gly) de cada tipo de proteína.

Tipo	Pm (kDa)	Porcentaje (%)	Gln (%)	Pro (%)	Phe (%)	Tyr (%)	Gly (%)
ω -gliadina	39-55	3-7	50	23	9	1	1
α/β -gliadina	28-35	28-33	37	16	4	3	2
γ -gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1	3
x-GLAPM	83-88	4-9	37	13	0	6	19
y-GLAPM	67-74	3-4	36	11	0	5	18
GLBPM	32-39	19-25	38	13	4	1	13

Además de los tres tipos de gliadina que hemos visto anteriormente, también existe un tipo de gliadinas minoritarias, con una proporción anormal de cisteínas en su secuencia aminoacídica, que frecuentemente son vinculadas a gluteninas (13). Éstas pueden aparecer tanto en la fracción soluble en etanol como en la insoluble, y se conocen con diversos nombres como gliadinas de alto peso molecular (GAPM), agregado de gliadinas o gluteninas solubles en etanol. Se cree que este tipo de gliadina puede actuar como terminador en la polimerización de las gluteninas (8). Las GAPM tienen uniones intercadenas con α/β -gliadinas, γ -gliadinas y moléculas de bajo peso molecular; de este modo las GAPM van a poseer un tamaño mayor que los tipos de gliadinas descritos anteriormente, entre 100 y 500 kDa (8, 12, 14).

- **Las gluteninas**

Las gluteninas son agregaciones proteicas complejas unidas por enlaces disulfuro entre cadena. Estas agregaciones poliméricas son insolubles en etanol al 60% y forman parte de las proteínas más largas conocidas. Su tamaño oscila entre 500.000 y 10.000.000 de Da (8). Las gluteninas son las responsables de la elasticidad y cohesividad que posee la harina de trigo. Cuando los enlaces disulfuro entre cadenas de las gluteninas se rompen, los monómeros y polímeros generados van a tener unas propiedades de solubilidad en etanol similares a las de las gliadinas. Según el tamaño de los polímeros generados tras la rotura de estos puentes disulfuro podemos dividir a las gluteninas en: gluteninas de bajo peso molecular (GLBPM) y gluteninas de alto peso molecular (GLAPM) (8).

Las GLBPM son las gluteninas predominantes y son similares a las α/β -gliadinas y γ -gliadinas, tanto en el peso molecular como en la composición de aminoácidos (13). De este modo las GLBPM van a presentar un dominio N-terminal con unidades repetitivas de glutamina y prolina tales como QQQPPFS y un dominio C-terminal con ocho residuos de cisteína (8, 13). Seis de estos residuos están en posiciones homólogas a los de α/β -gliadinas y γ -gliadinas, y permiten uniones disulfuro intracadena. Los dos residuos de cisteína adicionales, únicos en GLBPM, no pueden formar enlaces intracadena por lo que quedan libres para generar uniones intercadenas entre otras proteínas de gluten diferentes (8, 11).

Por otro lado encontramos las GLAPM que constituyen el menor componente proteico del gluten (10%) (6). La estructura de las GLAPM se caracteriza por presentar

tres dominios estructurales claros formados por: un dominio N-terminal no repetitivo (A) de 80-105 residuos, una región central (B) mayoritaria (480-700 residuos) formado por regiones repetitivas del hexapéptido QQPGQG con otros hexapéptidos (YYPTSP) y tripéptidos (ejemplo QQP o QPG) integrados y el dominio C-terminal de 42 residuos (C) (6, 8, 13). Los dos extremos A y C se caracterizan por la presencia de residuos de cisteína y la aparición de carga. Las GLAPM a su vez se pueden dividir en dos tipos según su peso molecular: “x” (entre 83-88 kDa) e “y” (entre 63-74 kDa). Las diferencias mayores entre las GLAPM- x y las GLAPM-y aparecen en los dominios A y B (6). Por ejemplo, el tipo “y” presenta menos unidades repetidas y más frecuentemente modificadas en el dominio B; y presentan una inserción de 18 residuos con dos cisteínas en el dominio A (8, 15).

- **Características de las prolaminas**

Las gliadinas y gluteninas se denominan comúnmente prolaminas debido a su alto contenido en prolina y glutamina, llegando a alcanzar entre un 60% y un 80% de la composición aminoacídica (1). No obstante, estos aminoácidos no son los únicos presentes en el gluten; otros aminoácidos minoritarios tales como la cisteína tienen una función importante en las propiedades físico-químicas del gluten. La cisteína, con un 2% de la composición total de los aminoácidos del gluten, es muy importante en la estructura y funcionalidad del gluten debido a su capacidad para formar puentes disulfuro intracadena e intercadena, es decir, es determinante en la formación del complejo entramado proteico del gluten (12).

A pesar de los diferentes tipos de prolaminas descritos con anterioridad y a las distintas estructuras expuestas, todas ellas comparten una organización estructural similar. En ella encontramos dominios conservados característicos de cada grupo, secuencias típicas en el extremo N-terminal y extensas regiones de secuencias repetitivas (1). Las secuencias repetidas están formadas por unidades estructurales de diferente longitud (4 a 9 aminoácidos) y secuencia, lo que determina un elevado polimorfismo. Estas regiones repetitivas son características de las prolaminas y en ellas siempre hay prolina y glutamina (2). Atendiendo a la estructura secundaria de las prolaminas, éstas presentan regiones α -hélice en los extremos N-terminal y C-terminal y en algunas secuencias intercalares. En cambio, las secuencias repetitivas exhiben una conformación estructural conocida como giro β , que a su vez determinan la formación de una estructura cilíndrica con 13 residuos por vuelta denominada

espiral- β . Esta conformación secundaria confiere a las prolaminas una estructura compacta, muy estable a la temperatura y a agentes desnaturalizantes (16).

Las prolaminas se encuentran en el endospermo del grano trigo donde constituyen la fuente primaria de nitrógeno necesaria para la síntesis de proteínas durante la germinación. Las gliadinas y gluteninas son proteínas de almacenamiento que constituyen casi la mitad del contenido proteico del grano de trigo maduro (1). Sin embargo, las prolaminas no son exclusivas del trigo; se encuentran presentes en todos los cereales. La cebada y el centeno son cereales evolutivamente relacionados con el trigo, perteneciendo los tres a la tribu *Triticeae*, y presentan grupos de proteínas, como las prolaminas, con alta similitud y propiedades físico-químicas en común (17). Estas prolaminas se denominan hordeínas o secalinas si se encuentran presentes en la cebada o el centeno respectivamente, y también se incluyen dentro del concepto de gluten (15, 18). En la Tabla 2 se muestran las estructuras homólogas comunes a los tres tipos de cereales. Es de destacar que no aparecen proteínas similares a α/β -gliadinas ni en la cebada ni en el centeno. Otras variedades de trigo como el kamut o la espelta, así como cereales híbridos como el triticale, procedente del cruzamiento entre trigo y centeno, también presentan prolaminas con alta similitud a las de sus cereales predecesores. Por tanto cuando comúnmente hablamos del gluten no nos referimos única y exclusivamente a las proteínas del trigo sino también a las de la cebada, el centeno, el triticale, el kamut y la espelta (19). Mención aparte merece la avena que, aunque se encuentra en la misma subfamilia que los cereales anteriores (*Pooideae*), pertenece a la tribu *Aveneae* y presenta algunas características diferentes. El análisis de la secuencia de las aveninas sugiere que, si bien existen secuencias de unidades repetitivas, estas difieren de las encontradas en el trigo, la cebada y el centeno (15, 18). La toxicidad de la avena está en discusión, aunque parece ser que el efecto nocivo de este cereal está muy ligado a la variedad (20).

Tabla 2: Clasificación de las prolaminas de trigo, cebada y centeno.

Prolaminas					
	<u>Gliadinas</u>			<u>Gluteninas</u>	
Trigo	ω -gliadinas	α/β -gliadinas	γ -gliadinas	GLBPM	GLAPM
Cebada	C-hordeínas	-	γ -hordeínas	B-hordeínas	D-hordeínas
Centeno	ω -secalinas	-	γ -secalinas	GLBPM-secalinas	GLAPM-secalinas

1.3- La toxicidad del gluten

Pese a la ubicuidad de las proteínas del gluten en la alimentación actual, existen varios grupos de individuos que no toleran el gluten en la dieta, entre los que se encuentran los enfermos celíacos (21). En condiciones normales, los componentes de origen proteico ingeridos en la dieta, como las prolaminas del gluten, son digeridos en productos de menor tamaño al llegar al tracto gastrointestinal. Esta función la llevan a cabo enzimas proteolíticas tales como la pepsina en el estómago y tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y elastasa en el intestino delgado. Como consecuencia de esta digestión, se generan productos de degradación que son absorbidos por los enterocitos para cubrir las necesidades nutricionales de aminoácidos requeridas por los seres humanos (22). Sin embargo, las prolaminas no son digeridas completamente en el tracto gastrointestinal debido a que presentan regiones ricas en glutamina y prolina. Este último aminoácido juega un papel crítico en la protección de los péptidos frente a la degradación proteolítica. La hidrólisis de enlaces peptídicos en los que participan residuos de prolina es producida, entre otras, por la actividad prolilendopeptidásica, y las enzimas proteolíticas humanas del tubo digestivo carecen de dicha actividad (23, 24). Esto hace a las proteínas del gluten resistentes a la digestión completa por enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal, generándose en el intestino delgado péptidos relativamente grandes ricos en prolina y glutamina. Algunos de estos péptidos van a tener un carácter tóxico para individuos susceptibles activando los procesos inflamatorios característicos de la enfermedad celíaca (23, 25).

Como consecuencia de esta digestión incompleta se generan dos tipos de péptidos involucrados en la patogenia de la enfermedad celíaca. Por un lado los péptidos tóxicos capaces de alterar rápidamente la mucosa activando la inmunidad innata (23). Dentro de estos péptidos se encuentra la región p31-43, o su forma elongada p31-49, de la α/β -gliadina, también conocido como péptido 19-mer (26). Maiuri L *et al.* (26) demostraron que este péptido estimula la producción de interleucina 15 por los enterocitos en cultivo de biopsias promoviendo la respuesta inmune. Está descrito que dicha citoquina aparece aumentada en pacientes celíacos y potencia el proceso inmunopatológico de la enfermedad (27). Además, el péptido p31-49 puede influir en la enterocitosis de las criptas y en la alteración de la mucosa de pacientes celíacos (28).

Por otro lado encontramos los péptidos inmunogénicos capaces de inducir la respuesta adaptativa. Estos péptidos estimulan a los linfocitos T con haplotipo DQ2 o DQ8 procedentes del intestino o de la sangre periférica de pacientes con enfermedad celiaca. La gran mayoría de péptidos inmunogénicos han sido identificados en estudios *in vitro* enfrentando fragmentos de las proteínas del gluten con líneas celulares de linfocitos T (28). Sin embargo, Anderson RP *et al.* (29) establecieron un trabajo innovador que permitía la detección de células T específicas del gluten, en la sangre periférica de pacientes celíacos, tras el consumo de una dieta con gluten durante tres días. El análisis de las células mononucleares aisladas de estos pacientes celíacos en diferentes condiciones dietéticas ha permitido caracterizar varios péptidos inmunogénicos (28). Es importante mencionar que la mayoría de péptidos capaces de estimular a los linfocitos T en líneas celulares son también tóxicos en el ensayo de Anderson RP *et al.* (28). La detección de péptidos inmunogénicos también puede llevarse a cabo mediante análisis bioinformáticos que tienen en cuenta la riqueza de glutamina y prolina, su localización en la secuencia primaria, así como la presencia de otros aminoácidos. La toxicidad de los péptidos inmunogénicos puede variar de un paciente a otro, de modo que se conoce como péptidos inmunodominantes a aquellos capaces de inducir una respuesta inmune específica en casi todos los pacientes celíacos (28).

Los péptidos inmunogénicos principales han sido identificados en las α/β -gliadinas y en las γ -gliadinas. En las α/β -gliadinas encontramos uno de los péptidos más perjudiciales del gluten: el péptido 33-mer, situado en la región p57-p89. Su alto carácter inmunogénico radica en la presencia de seis copias de tres epítopos inmunoestimuladores diferentes, su capacidad para resistir la actividad proteolítica del tracto digestivo y la facilidad de unión de este péptido, *per se*, al heterodímero DQ2 de las células presentadoras de antígeno (25, 28, 30). Otro péptido inmunogénico que encontramos en la región p57-p73 de las α/β -gliadinas es el 17-mer. Este es un péptido truncado del 33-mer y presenta una toxicidad similar. Dentro de las ω -gliadinas encontramos un análogo al 17-mer conocido como DQ2- ω -1. Ambos péptidos, 17-mer y DQ2- ω -1, presentan dos regiones inmunodominantes. Sin embargo, es en las γ -gliadinas donde aparece la mayor cantidad de regiones inmunogénicas del gluten (28). Un análisis proteolítico de las γ -gliadinas permitió la identificación del péptido 26-mer con unas características tóxicas similares a las del 33-mer (23). En cambio, pocos péptidos derivados de las gluteninas, las secalinas y las hordeínas han sido descritos como estimulantes de líneas celulares T CD4+ (28). En resumen, se han descrito una

gran variedad de péptidos derivados del gluten capaces de inducir la respuesta inmunogénica en pacientes celíacos (23, 28).

2- La enfermedad celíaca

2.1- Concepto e historia de la enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado que aparece en individuos genéticamente susceptibles y es causada por una respuesta inmune inapropiada a las proteínas del gluten presentes en el trigo, así como a proteínas similares de cebada y centeno (31, 32). Como consecuencia, se produce una lesión de la mucosa del intestino delgado superior que provoca una alteración en la absorción y utilización de nutrientes, cuya repercusión clínica y funcional es variable según el grado de atrofia de la mucosa (32, 33).

La EC es una de las intolerancias alimentarias más comunes en la actualidad, con una prevalencia de entre un 0,5-1% en la población mundial (27). Sin embargo, existe un número considerable de casos no diagnosticados debido a las diferentes formas clínicas que presenta (34). Durante años la EC fue considerada una patología poco frecuente que afectaba fundamentalmente a niños de origen caucásico, más concretamente del fenotipo característico de latitudes nórdicas (35, 36). En la actualidad, la EC presenta una distribución mundial, cuya prevalencia en las distintas poblaciones va a depender de la frecuencia con la que aparecen los genes relacionados con la enteropatía y del tipo de dieta cultural asociado a la población (36, 37). De este modo, existe una prevalencia muy alta en los países nórdicos y prácticamente nula en otros países como puede ser Japón (38). Sin embargo, la globalización de los hábitos alimenticios ha hecho que se incremente el número de casos diagnosticados en poblaciones que no poseían una incidencia alta de la enfermedad (4). La proporción de pacientes diagnosticados también se ve condicionada por el grado de conocimiento de la enfermedad por parte de los profesionales sanitarios, así como por la accesibilidad a las pruebas diagnósticas (38). En la actualidad el número de enfermos diagnosticados ha aumentado considerablemente, debido principalmente a un mayor conocimiento de las formas clínicas de la celíaca y a la aparición de los métodos de diagnóstico serológicos (37). Inicialmente se pensaba que esta enteropatía estaba asociada a la edad infantil; sin embargo en la actualidad este axioma también ha desaparecido (39). Hoy en día, se

sabe que la EC puede ser diagnosticada a cualquier edad; pese a que se manifiesta más comúnmente durante los primeros meses (de los 9 a los 24 meses) o durante la tercera o cuarta década de la vida (40). Por otro lado, como ocurre en otros desórdenes autoinmunes, la EC es más común en mujeres que en hombres con un ratio de prevalencia de 3:1 (27).

La EC no es una enfermedad nueva. Se describió por primera vez en la segunda mitad del siglo II d.C por Arateus de Cappadocia, médico helenista-romano. En su extenso trabajo publicado en 1552, empleó la palabra griega “koeliacos”, cuyo significado era “que sufren del intestino”, para identificar a unos pacientes con problemas digestivos acompañados de adelgazamiento y debilidad (41). Pero no fue hasta 1888 cuando el doctor Samuel Gee hizo la primera descripción clínica precisa y detallada de la EC tal y como la conocemos hoy en día. Samuel Gee postuló que “la regulación de la alimentación es la parte más importante del tratamiento” (41, 42). Aunque los clínicos empezaron a reconocer y diagnosticar la EC, su etiología permaneció desconocida durante más de 50 años. Posteriormente, en 1940, el pediatra holandés WK Dicke se refirió a los cereales (trigo, cebada y centeno) como agentes etiológicos de la EC y propuso a los enfermos celíacos seguir una dieta estricta sin gluten, tras la cual los pacientes mostraban una clara mejoría (42, 43). Dicke llegó a esta conclusión al observar que durante la Segunda Guerra Mundial, período en el que escaseaban alimentos básicos como el trigo, los pacientes celíacos mejoraban considerablemente; sin embargo, la reintroducción de dichos alimentos en la dieta tras la guerra se asociaba con un empeoramiento de los pacientes (43). Dicke identificó así el factor etiológico principal de la enfermedad, el gluten, aunque se desconocían sus efectos a nivel gastrointestinal. En la década de los 60 quedan demostradas las alteraciones histológicas que produce el gluten y que habían sido negadas durante años (42, 44, 45). No obstante, no será hasta 1970 cuando se publique por primera vez una definición consensuada de la EC en la revista *Acta pediátrica*. Esta publicación define la EC como una condición permanente de intolerancia al gluten asociada con una inflamación de la mucosa intestinal y que revierte tras un período en el cual el gluten era excluido de la dieta (31).

En la actualidad la EC se considera un desorden multisistémico, más que un daño únicamente gastrointestinal, cuya etiología es multifactorial y en parte desconocida (46). El gluten es el principal desencadenante de la enfermedad, de modo que la simple presencia o eliminación del gluten de la dieta puede activar o detener el proceso patológico (4). Sin embargo, la enfermedad no sólo se debe a la ingesta de gluten en la dieta, una predisposición genética del individuo es necesaria

para el desarrollo de la EC, así como la implicación de otros factores ambientales desconocidos (31).

2.2- Clínica y diagnóstico de la enfermedad celiaca

El diagnóstico de la EC se establece mediante una combinación de hallazgos clínicos, serológicos e histológicos; todo ello asociado a una buena respuesta durante un período en el que el paciente lleva una dieta libre de gluten (47). Según las directrices de la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica (ESPGHAN) de 1990, el diagnóstico de la EC se basa: (i) en la presencia de anticuerpos antitransglutaminasa o antiendomiso en el suero en el momento del diagnóstico, y su desaparición tras una correcta dieta sin gluten; (ii) en la detección de atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas en la mucosa duodenal, junto con una inflamación en el epitelio y la lámina propia de esta, mientras el paciente consume gluten en la dieta; (iii) y una remisión clínica e histológica después de una retirada total del gluten consumido en la dieta (48).

El examen clínico es realmente complicado debido a las numerosas formas de presentación de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas de los pacientes celíacos varían considerablemente de unas personas a otras y son muy dependientes de la edad del afectado (27). Como dijimos anteriormente, la enfermedad aparece con más frecuencia durante la infancia o durante la tercera o cuarta década de la vida (40). En los niños pequeños son frecuentes los síntomas intestinales (diarrea, deposiciones grasas, distensión abdominal, desnutrición) y retraso en el desarrollo. No obstante, vómitos, irritabilidad y anorexia también son muy comunes. En cambio, en adultos, la enfermedad puede cursar sin síntomas o con síntomas atípicos y puede ir asociada a la aparición de complicaciones extraintestinales (49).

El desarrollo de las pruebas serológicas para la EC supuso una revolución en el diagnóstico de la enteropatía. Dentro de estas pruebas encontramos los marcadores genéticos de riesgo, que permiten detectar la susceptibilidad genética basada en el haplotipo HLA, así como los anticuerpos antiendomiso, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular y anticuerpos antigliadina (50). Sin embargo, la biopsia endoscópica del intestino delgado sigue constituyendo la clave diagnóstica de la EC (51). La muestra duodenal de los pacientes celíacos se caracteriza por presentar linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de criptas y atrofia vellositaria (Figura 1). Esta

arquitectura duodenal patológica es capaz de revertir tras un período en el que el paciente lleva a cabo una dieta estricta sin gluten (27).

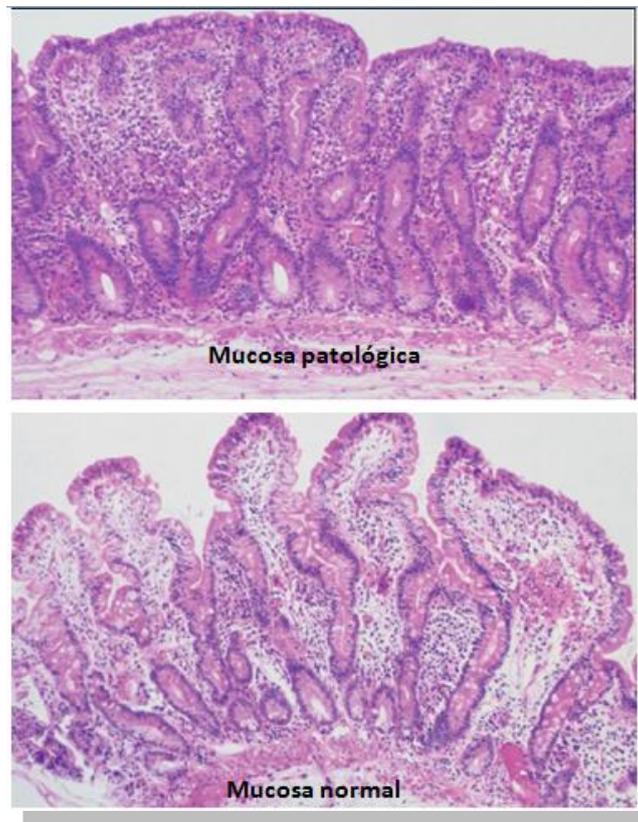


Figura 1: Comparación de la arquitectura vellositaria en la biopsia duodenal de un individuo sano y un paciente con EC. La mucosa patológica presenta una mucosa plana con incremento de linfocitos intraepiteliales y una marcada hiperplasia de criptas.

Se estima que la EC tiene una prevalencia de entre un 0,5-1% en la población mundial (27). Sin embargo, existe un número considerable de casos no diagnosticados como consecuencia de las diferentes formas clínicas que presenta. Se considera que tan solo un 20% de los afectados por EC han sido diagnosticados debido a que esta enfermedad se ha relacionado durante años con su forma clásica de presentación clínica (34). En la actualidad, gracias a la aparición de los marcadores serológicos, se han definido distintas formas de la enfermedad que han permitido un mayor número de casos diagnosticados (52). La variabilidad clínica de la EC y el difícil diagnóstico de algunas de éstas hace que se compare a la población de enfermos celíacos con un iceberg. En esta representación, las formas sintomáticas serían la parte visible del iceberg, y aparecen unos conceptos nuevos constituyendo un nuevo espectro clínico

de la enfermedad (Figura 2) (52). De este modo, podemos dividir la EC según su presentación clínica en:

- EC clásica o sintomática: Se caracteriza por presentar síntomas gastrointestinales típicos, serología positiva y una biopsia duodenal característica de la enfermedad. Es la más fácil de detectar y constituye la punta del iceberg (31).
- EC silente: La sintomatología es prácticamente nula, pero los enfermos tienen la mucosa intestinal alterada y presentan marcadores serológicos positivos (53).
- EC latente: Se trata de enfermos asintomáticos con predisposición genética que pueden desarrollar la enfermedad de manera súbita (31, 54).
- EC potencial: Comprende a los pacientes que tienen predisposición genética y presentan alteraciones inmunológicas, sin embargo las vellosidades intestinales están intactas. Estas tres últimas formas constituyen la parte sumergida del iceberg (53).

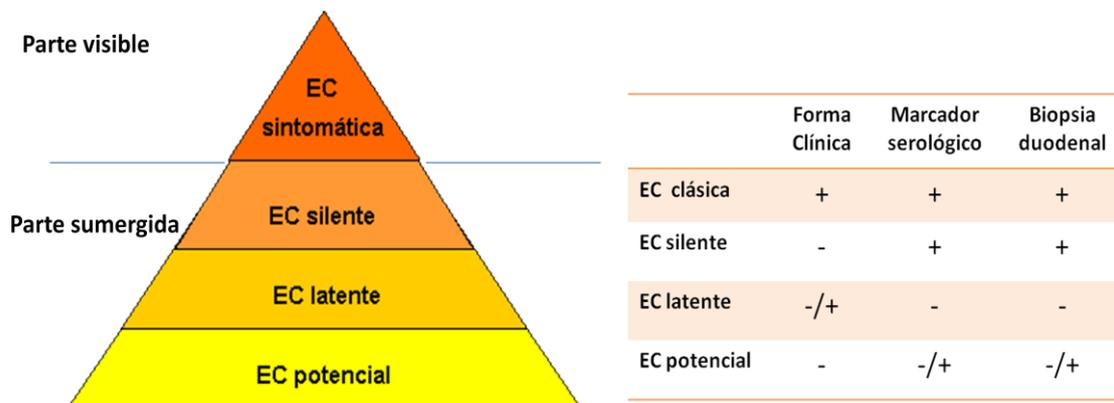


Figura 2: Modelo de iceberg para explicar las diferentes formas clínicas de la EC. La parte sumergida corresponde a las nuevas formas clínicas de la enfermedad (EC silente, EC latente y EC potencial). En cambio la parte visible la forma la EC clásica o sintomática.

2.3 Patogénesis de la enfermedad celíaca

La etiología de la EC es multifactorial y en parte desconocida. Aunque el gluten es el principal desencadenante de la enteropatía, es necesaria la presencia de una

susceptibilidad genética para padecer la enfermedad. Sin embargo, no todos los individuos con predisposición genética que ingieren gluten manifiestan la alteración. Esto es debido a que existen otros factores genéticos o ambientales desconocidos involucrados en la patogenia de la EC (33, 46).

- **Factor desencadenante: el gluten**

En condiciones no patológicas la respuesta frente a proteínas de la dieta, como el gluten, es de tolerancia oral. Esta tolerancia oral se define como la falta de respuesta inmune sistémica frente a determinados antígenos ingeridos en la dieta (55). Los principales mecanismos mediante los cuales actúa la tolerancia oral incluyen la delección clonal (apoptosis de las células efectoras), la anergia clonal (inactivación de las células efectoras) y la inducción de células T reguladoras, que ejercen su función mediante citoquinas (56). Sin embargo, no se conocen al detalle los procesos que se producen a la hora de conseguir esta tolerancia oral. Parece ser que en sanos las células presentadoras de antígeno (CPA) realizan una exposición antigénica a linfocitos T, en ausencia de otras señales coestimuladoras, que favorece la diferenciación de células T reguladoras (56, 57). Éstas son las principales células homeostáticas del sistema inmune y controlan el desarrollo de los fenómenos de tolerancia (56). Las mismas células presentadoras de antígeno capaces de favorecer la respuesta tolerogénica, también pueden iniciar la respuesta inmunológica en respuesta a señales de peligro, y esto es lo que ocurre en pacientes con EC (57). Por tanto, el gluten es el principal desencadenante de la enfermedad celiaca en individuos susceptibles, de modo que la simple presencia o eliminación del gluten de la dieta puede activar o detener el proceso patológico (4). La teoría más aceptada hoy en día sobre la patogénesis de la EC es la inmunológica, que considera que el gluten tiene un efecto dual sobre la mucosa del intestino delgado, generando una respuesta innata y otra adaptativa (58).

Respuesta innata: La digestión parcial del gluten en el tracto digestivo genera péptidos tóxicos, como el 19-mer, que tienen un efecto rápido e inespecífico sobre el epitelio duodenal (26). Esta respuesta inespecífica se caracteriza por la presencia de interleucina 15 proveniente de los enterocitos del epitelio y de las células mononucleares de la lámina propia (27). Como consecuencia se produce un estrés oxidativo que conlleva una linfocitosis enterocitaria y un debilitamiento de las uniones *tightjunctions* entre los enterocitos. Éste debilitamiento de las *tightjunctions* podría

generar un aumento de la permeabilidad en la mucosa duodenal permitiendo la entrada de otros péptidos del gluten a la lámina propia. Los péptidos del gluten que entran a la lámina propia van a ser responsables de que se desencadene la respuesta adaptativa (26, 58, 59).

Respuesta adaptativa: La digestión incompleta del gluten, debida a la gran cantidad de residuos de prolina, genera péptidos muy grandes, como el 33-mer, capaces de inducir una respuesta adaptativa en pacientes celíacos. Estos péptidos pueden atravesar la barrera epitelial y llegar a la lámina propia donde se activa la inmunidad adaptativa (58). La respuesta comienza con la desaminación de los péptidos inmunogénicos mediante la transglutaminasa tisular (TG2), una enzima dependiente de calcio y ubicada en el organismo que es liberada en la mucosa intestinal en condiciones de estrés. Su función fisiológica es la reparación tisular mediante una reacción de transamidación en la que participan enlaces de lisina y glutamina (10, 28). En presencia de agua y a pH bajo, la TG2 lleva a cabo una desaminación específica de residuos de glutamina y los convierte en ácido glutámico con carga negativa. Como consecuencia de este proceso de desaminación, se favorece la interacción de estos péptidos con las moléculas HLA-DQ2 y DQ8 de las CPA (28, 33). Las principales CPA de la submucosa son macrófagos y células dendríticas, las cuales son las encargadas de la presentación antigénica de los péptidos del gluten a las células T CD4+. Estos linfocitos producirán una serie de citoquinas, entre las que se encuentra el interferón gamma, provocando una elevada respuesta inmunitaria en la lámina propia de la submucosa característica de la EC (46, 60).

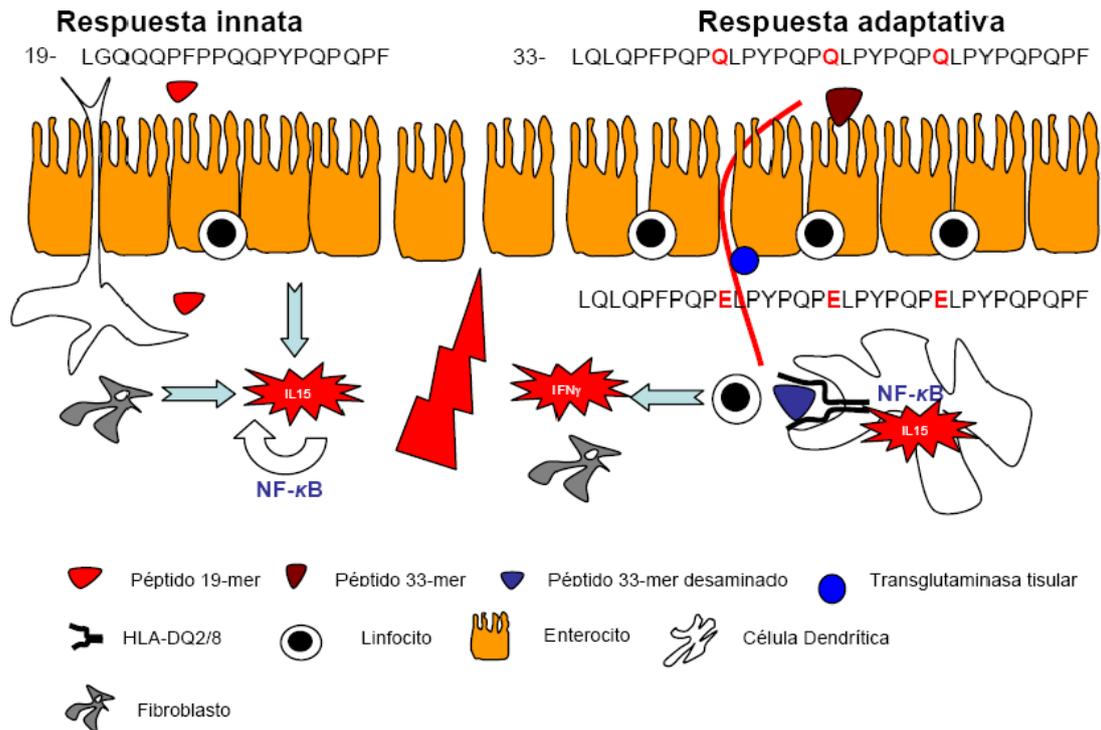


Figura 3: Modelo inmunopatológico de la enfermedad celiaca. El gluten tiene un efecto dual sobre la mucosa del intestino generando una respuesta inmune innata y otra adaptativa. La respuesta innata se caracteriza por la producción de interleucina 15 por los enterocitos del epitelio y las células mononucleares de la lámina propia. Como consecuencia se produce un estrés oxidativo que conlleva una linfocitosis enterocitaria y un debilitamiento de las uniones *tightjunctions* entre los enterocitos. En cambio, la respuesta adaptativa se caracteriza por la desaminación de péptidos tóxicos del gluten por la TG2 en la lámina propia. Esta desaminación favorece la interacción de los péptidos del gluten con las moléculas HLA-DQ2 y DQ8 de las CPA. Las CPA son las encargadas de la presentación antigénica de los péptidos del gluten a las células T CD4+. Como consecuencia se producirán una serie de citoquinas provocando una elevada respuesta inmunitaria en la lámina propia de la submucosa (61).

- **Componente genético: el polimorfismo HLA**

El hecho de que el gluten resulte inofensivo para la mayor parte de la población demuestra que la susceptibilidad del individuo es crucial para desarrollar la enfermedad (27). El alto componente genético de la EC queda de manifiesto en varios trabajos en los que se analiza la incidencia de esta enteropatía en familiares de pacientes celiacos. En estos estudios se muestra que la tasa de concordancia de EC entre gemelos monozigotos corresponde al 80%, mientras que en individuos dizigotos solo es del 11% (62, 63). Los estudios llevados a cabo en familiares de primer grado muestran una incidencia de un 10%, que corresponde a un riesgo 20 veces mayor que

para la población general (64). Por tanto, es necesaria una predisposición genética por parte del individuo para padecer la EC.

Dentro de los factores genéticos, está ampliamente demostrado que los genes del complejo mayor de histocompatibilidad que conforman el sistema HLA (antígeno leucocitario humano) de clase II se encuentran implicados en la enfermedad (65). En la mayoría de las poblaciones de celíacos estudiadas, más del 90-95% de los pacientes expresan el heterodímero HLA-DQ2. Principalmente las isoformas DQ2.5 (codificado por los alelos DQA1*0501 y DQB1*0201) y DQ2.2 (codificado por DQA1*0201 y DQB1*0202). El otro 5-10% restante de pacientes celíacos son HLA-DQ8 (DQA1*03 y DQB1*0302) (66, 67). Estos heterodímeros juegan un papel central en la patogénesis de la enfermedad debido a que se encuentran en la membrana de las células presentadoras de antígeno y tienen alta afinidad por los péptidos del gluten desaminados por la transglutaminasa tisular (28). Sin embargo, los alelos que los codifican se encuentran en un 30-40% de la población mundial de los cuales se estima que tan solo un pequeño porcentaje sufre la EC. Por tanto, la presencia de las proteínas HLA-DQ2/DQ8 es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la EC (27, 28).

El HLA parece aportar no más del 40% del riesgo genético de la enfermedad. El 60% restante sería debido a la acción de numerosos genes de efecto menor (68). Otras zonas genómicas relacionadas con la EC se encuentran en el cromosoma 2 (región 2q33); el cromosoma 5 (5q31-33) y en el 19 (19p13.1) (63, 69-71). Sin embargo no son las únicas descritas. Es notable mencionar que la mayoría de estos genes están involucradas en la respuesta inmune (28). A pesar de ello, todas las regiones génicas relacionadas con la EC, diferentes al HLA, sólo explican entre 3-4% de la herencia de la enteropatía, sugiriendo la existencia de otros muchos genes aún por determinar (69).

- **Otros factores ambientales**

No todos los individuos con predisposición genética que ingieren gluten manifiestan la EC, por tanto se postula que otros factores ambientales de origen desconocido podrían tener un papel importante en el desarrollo de la enteropatía (67). Dentro de estos factores ambientales se ha sugerido que la lactancia materna, el momento de introducción del gluten en la dieta del niño celíaco o las infecciones intestinales podrían tener una implicación importante (72).

El período de lactancia es muy importante en el bebé debido a las ventajas de tipo inmunológico de la leche materna. Entre los años 1973 y 1997, Suecia experimentó una epidemia de EC en niños menores de 2 años, donde la incidencia de la enfermedad se incrementó 3 veces (73, 74). La epidemia en cuestión fue explicada por un aumento en la proporción de los lactantes a los que se introducían cantidades relativamente grandes de gluten después del destete. Este hecho se produjo por cambios en los hábitos sociales de la población, en las recomendaciones dietéticas nacionales y en el contenido de los alimentos infantiles producidos industrialmente (75). Ivarsson A *et al.* (76), mostraron cómo la introducción del gluten durante el período de lactancia podía producir un descenso de enfermos en individuos genéticamente susceptibles. Por otro lado, una mayor duración de la lactancia materna también podría estar asociada con un riesgo menor de padecer la EC (77). Se ha especulado que podría modular el proceso de exposición del neonato a la microbiota intestinal, además de prevenir la inflamación del intestino y disminuir el paso de péptidos tóxicos del gluten a la lámina propia de la submucosa (78, 79). Sin embargo, aún no queda claro si la lactancia natural proporciona una verdadera protección a largo plazo, o simplemente retrasa la aparición de los síntomas y, por tanto, el diagnóstico de la EC (79).

Otro factor de riesgo parece ser el momento de introducción del gluten en la dieta del bebé, independientemente de la lactancia materna. A este respecto, se han hecho estudios para valorar la edad más adecuada para introducir el gluten en la dieta, observándose que tanto una introducción temprana (inferior a los tres meses) como muy tardía (superior a los 7 meses) se asociaba con un riesgo incrementado de padecer EC (80). Además, parece que la dosis de gluten ingerido durante la infancia puede influir en el desarrollo de la enfermedad (48). Por tanto, se considera que la edad en la que se introduce el gluten en la dieta, la cantidad de gluten ingerida, así como los patrones de lactancia podría jugar un papel importante a la hora de manifestarse la EC (81).

Así mismo, varios artículos han apoyado la hipótesis de que las infecciones intestinales también pueden jugar un rol importante en el desarrollo de la EC (80). Kagnoff MF *et al.* (81) descubrieron que el adenovirus enterocitario humano 12 poseía la proteína E1B con una secuencia de 12 aminoácidos idéntica a un péptido 12-mer presente en las gliadinas. Según estos autores, la similitud entre la proteína vírica y el péptido 12-mer podría favorecer una reacción cruzada en el organismo y, con ello, el desencadenamiento de la enfermedad. Un modelo similar fue propuesto para el hongo dimórfico *Candida albicans*. Este hongo presenta la proteína HWP1 en la pared de la

hifa que contiene una secuencia similar a péptidos inmunotóxicos presentes en las α/β y las γ gliadinas. La proteína HWP1 es sustrato de la TG2 y es usada por *Candida albicans* para adherirse al epitelio intestinal (82). Otro estudio en el que se analizaba el posible papel de los virus en la EC, llevado a cabo por Stene LC *et al.* (83), mostró una relación entre la infección de rotavirus y el riesgo de padecer EC en niños. Los rotavirus son una de las causas más frecuentes de infecciones gastrointestinales en niños y son capaces de inducir procesos inflamatorios, cambios estructurales en el intestino y un aumento de la permeabilidad intestinal. Sin embargo, ninguna de estas teorías ha sido probada ni confirmada en la actualidad.

Los trabajos de Forsberg G *et al.* (84), abrieron un nuevo interrogante en el desencadenamiento de la EC: ¿Podría la microbiota intestinal estar relacionada con la EC? Estos autores encontraron por microscopía electrónica de barrido unas bacterias bacilares ancladas en el duodeno de niños con EC, que no estaban presentes en los individuos sanos. Este estudio sugirió por primera vez el posible papel de las bacterias en la patogénesis de la EC. Desde entonces muchos trabajos han descrito un desequilibrio en la microbiota intestinal de los pacientes celíacos (72). La mayoría de ellos se han centrado en la caracterización de la microbiota duodenal de pacientes celíacos (tratados y no tratados) y de individuos sanos, debido a que la EC es una alteración que afecta a la parte superior del intestino delgado. Trabajos como los de Collado MC *et al.* (85-87) y Nadal I *et al.* (88) muestran un desequilibrio en la microbiota duodenal de niños con EC. Un estudio reciente llevado a cabo por Nistal E *et al.* (89), mediante la construcción de una colección de clones del ADNr 16S, describió diferencias en la microbiota en función de la edad (diferencias significativas entre niños celíacos y adultos celíacos); y de la dieta (diferencias significativas entre celíacos activos y tratados). Sin embargo, no se mostraron diferencias claras asociadas al diagnóstico de la enfermedad. Aunque se desconoce si la microbiota duodenal está implicada en el proceso patogénico de la EC, parece que los pacientes celíacos presentan frecuentemente una microbiota intestinal alterada (72).

2.4- Tratamiento de la enfermedad celíaca

La EC es una enfermedad compleja y, a pesar de los grandes avances en su conocimiento, el único tratamiento aceptado actualmente es una dieta completamente libre de gluten de por vida (DSG) (17). En la mayoría de los pacientes el cumplimiento estricto de la DSG conduce, en pocos meses, a la recuperación rápida y completa de

la arquitectura y la funcionalidad de la mucosa del intestino delgado (34). Sin embargo, el mantenimiento de la DSG no es una tarea sencilla. La eliminación completa del gluten de la dieta es complicada debido a la naturaleza ubicua de estas proteínas, a la contaminación cruzada de alimentos y al etiquetado inadecuado de los mismos (90). Además este tratamiento puede tener un impacto negativo en la calidad de vida del paciente celiaco, pudiendo producir un estrés psicológico, económico y social (10). Estudios nutricionales han mostrado que la DSG también puede acarrear deficiencias en micronutrientes tales como el hierro, calcio, magnesio, zinc, vitamina D, vitamina B12, ácido fólico, etc. (91). Finalmente, un pequeño grupo de pacientes con EC (2%-5%) no presentan una respuesta clínica ni histológica a la retirada del gluten de la dieta. Esta complicación de la enteropatía se conoce como EC refractaria (67). Por tanto, aunque una dieta libre de gluten es segura y efectiva para la mayoría de los pacientes celiacos, la presencia de las complicaciones citadas con anterioridad hace necesario la aparición de nuevos tratamientos innovadores para la EC (10). Existen numerosas líneas de investigación que pueden actuar a distintos niveles y cuya finalidad es el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la EC (67).

- **Estrategias para reducir la exposición de los péptidos tóxicos del gluten al sistema inmune**

El objetivo de estas estrategias es conseguir una disminución en la llegada de péptidos inmunotóxicos del gluten a la lámina propia de los pacientes celiacos, donde se desencadena la respuesta inmune. El primer lugar de actuación es en los propios alimentos reduciendo su toxicidad antes de la ingesta. Para ello, se llevan a cabo estrategias como la modificación genética del grano de trigo o el tratamiento enzimático de la masa del gluten (sourdough) (10, 67). La modificación genética del trigo se puede llevar a cabo por diferentes técnicas tales como el cultivo selectivo, la manipulación genética o la tecnología de RNA de interferencia. Éstas permiten una reducción considerable de los péptidos inmunológicos; sin embargo suelen ir acompañadas con una pérdida de las características especiales del trigo (67). Por otro lado, el tratamiento enzimático del sourdough consiste en la hidrólisis enzimática de regiones tóxicas de la masa durante la elaboración del alimento. Se puede llevar a cabo mediante un pre-tratamiento de la masa con bacterias proteolíticas o con enzimas transglutaminasa (67). Existen varias formulaciones, compuestas principalmente por cepas proteolíticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, capaces de hidrolizar considerablemente regiones inmunotóxicas del gluten como el

33-mer (92-94). Sin embargo, los resultados sugieren largos períodos de fermentación con las bacterias ácido-lácticas para conseguir una reducción considerable en la toxicidad del gluten. Más novedoso es el uso de transglutaminasas microbianas en el tratamiento de la masa de trigo. Gianfrani C *et al.* (95) demostraron que una transglutaminasa microbiana en determinadas condiciones era capaz de atenuar péptidos de gliadina que se unen a las moléculas HLA-DQ2 de las células presentadoras de antígeno.

La terapia enzimática oral ofrece otro camino para reducir la cantidad de péptidos inmunogénicos del gluten que llegan al intestino delgado. Esta técnica consiste en la presencia de proteasas capaces de hidrolizar gluten en la parte alta del tracto digestivo (estómago y duodeno), impidiendo que se generen los péptidos inmunogénicos en el duodeno (28). Las principales enzimas que se utilizan en este proceso son las prolilendopeptidasas (PEP). Precisamente, las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal de mamíferos carecen de actividad PEP y es el motivo por el que se generan grandes péptidos y potencialmente inmunogénicos (10, 67). Estas enzimas aparecen en muchos microorganismos y plantas. Se han analizado PEP de bacterias como *Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulata* y *Myxococcus xanthus* capaces de hidrolizar péptidos ricos en prolina. Sin embargo estas enzimas se inactivan en el estómago debido al pH ácido y a la acción de la pepsina (96). Para que las PEP puedan ser utilizadas en terapia enzimática oral tienen que resistir las condiciones adversas del estómago, no ser hidrolizadas por las proteasas digestivas humanas y llevar a cabo su función hidrolítica principalmente en el estómago (97). Gass J *et al.* (98, 99) demostraron que la combinación de la PEP de *Sphingomonas capsulata* con una endoproteasa específica de la semilla de la cebada permiten eliminar eficientemente los péptidos del gluten incluso a pH ácido. Esta combinación enzimática se encuentra en ensayo clínico como ALV003 (99, 100). Otra PEP capaz de eliminar péptidos ricos de prolina la encontramos en el hongo *Aspergillus niger*. Esta enzima presenta su óptimo de actividad a pH ácido y es capaz de digerir eficientemente los péptidos del gluten en las condiciones ácidas del estómago (101, 102).

Otras alternativas para prevenir la llegada de los péptidos inmunogénicos del gluten a la lámina propia de la mucosa se basan en una reducción de la absorción del gluten a través del epitelio intestinal. Este proceso se puede llevar a cabo mediante polímeros de alto peso molecular que se unen selectivamente al gluten e impiden el paso a través de las células epiteliales, o mediante un descenso de la permeabilidad intestinal que, como vimos anteriormente, aparece aumentada en pacientes con EC

(67, 103, 104). En el último caso encontramos el compuesto acetato larazotide que actúa como inhibidor de la permeabilidad intestinal bloqueando los receptores de zonulina y regulando las uniones *tightjunctions* entre células (105, 106).

- **Estrategias para inhibir las señales pro-inflamatorias y la activación de las células T**

Una vez que los péptidos tóxicos del gluten llegan a la lámina propia del paciente celiaco son desaminados por la transglutaminasa tisular. Estos péptidos tienen una gran afinidad por las CPA encargadas de la presentación antigénica a las células T CD4+. Como consecuencia de esta presentación, se producen una serie de citoquinas, como el interferón gamma, que provocan una elevada respuesta inmunitaria en la lámina propia de la submucosa (46). Por tanto, las terapias destinadas a bloquear cualquiera de los procesos necesarios para que la inmunidad adaptativa se produzca, son tratamientos potenciales para la EC (107). Por ejemplo, existen inhibidores de la transglutaminasa tisular, como la cistamina, que impiden que esta enzima desamine los péptidos del gluten y así pierdan afinidad por las CPA. Además, se están probando bloqueadores de gran analogía para las moléculas HLA-DQ2 que impidan la unión de estas moléculas con los péptidos del gluten; así como inhibidores de la migración de células T (67). Otras estrategias similares tienen como objetivo la inhibición de las señales pro-inflamatorias generadas en la respuesta inmunológica como pueden ser anticuerpos contra la interleucina 15 y el interferón γ , o inhibidores de metaloproteinasas importantes en el daño intestinal (67). Sin embargo, todas estas terapias pueden conllevar riesgos implícitos al bloquear parte de la respuesta inmune (10).

- **Otras estrategias**

Varias líneas de investigación tienen como objetivo restablecer la tolerancia oral a los péptidos del gluten. Dentro de estos trabajos encontramos la inmunización utilizando péptidos antigénicos capaces de generar células T reguladoras. Éstas son las principales células homeostáticas del sistema inmune y tienen un papel central en el control de la inflamación al inhibir la respuesta de los linfocitos Th1 y la liberación del interferón γ característicos de la EC (108). Otro método para restablecer la tolerancia oral y modular la homeostasis intestinal es mediante el uso de

microorganismos probióticos. Se ha demostrado que algunas cepas bacterianas, pertenecientes principalmente al grupo de los lactobacilos y las bifidobacterias, son capaces de atenuar la respuesta inmune generada por los péptidos del gluten. Estudios previos han mostrado que cepas de *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium lactis* pueden ejercer un efecto protector frente a la respuesta inflamatoria y al daño a la mucosa generado por los péptidos de gliadina. Precisamente la cepa *B. longum* CECT 7347 se está empezando a utilizar en formulaciones alimentarias como complemento a la DSG (109-111). Dentro del género *Lactobacillus*, se han descrito cepas de *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *Lactococcus lactis* que tienen un efecto inmunomodulador en el intestino (112, 113). Una de las preparaciones probióticas con posibles efectos beneficiosos en la EC es VSL#3. Ésta se encuentra formada por bacterias ácido lácticas y bifidobacterias capaces de hidrolizar péptidos inmunológicos, como el 33-mer (94). Además del uso de bacterias, otra forma de modular la homeostasis intestinal de alergias y enfermedades autoinmunes es mediante el uso de helmintos como *Necator americanus* (67).

En el caso de complicaciones en la respuesta al tratamiento de la DSG, como ocurre en pacientes con EC refractaria, los tratamientos van destinados a la supresión del sistema inmune mediante el uso de potentes corticoesteroides. En estos casos, además de drogas inmunosupresoras, también se investiga con el uso de células madre o la introducción de agentes que permitan la restauración intestinal. Sin embargo, estos tratamientos pueden conllevar efectos secundarios importantes (67).

3- El metabolismo del gluten

3.1- Metabolismo de proteínas

Los seres humanos necesitan la asimilación de aminoácidos como requerimiento nutricional esencial. Para ello, las proteínas consumidas en la dieta sufren un proceso digestivo a lo largo del tracto gastrointestinal hasta generar productos fácilmente asimilables (22). Debido a la naturaleza proteica del gluten, este componente del trigo se encuentra expuesto a procesos metabólicos similares al del resto de las proteínas, salvo por algunas características especiales que se verán más adelante (24). En este apartado vamos a dividir el metabolismo de proteínas en digestión y absorción.

- **Digestión de proteínas**

Una dieta occidental típica contiene aproximadamente 100 g de proteína al día (114). Además, a este consumo de proteínas hay que sumarle las secreciones proteicas salivares y gastrointestinales (35 g/día aproximadamente) que también son metabolizadas (22). Se considera que la digestión de las proteínas comienza en el estómago gracias a la actuación de la pepsina. La pepsina es secretada por las células principales como un zimógeno llamado pepsinógeno (22). Este precursor se activa por el pH ácido que se encuentra en el lumen del estómago y por el proceso de autocatálisis mediante el cual la propia pepsina es capaz de actuar sobre el pepsinógeno inactivo para generar más pepsina. La activación de esta enzima inicia la digestión de proteínas en el estómago generando largos polipéptidos parcialmente digeridos que llegan al intestino delgado (115).

La digestión proteica tiene lugar principalmente en el intestino delgado (114). Cuando el contenido del estómago llega al intestino delgado, las células endocrinas del duodeno se estimulan por la bajada de pH y la llegada del bolo alimenticio, secretando las hormonas secretina y colecistoquinina. La secretina actúa en el páncreas y en los conductos biliares del hígado induciendo la secreción de bicarbonato que permite la neutralización del pH. En cambio, la colecistoquinina estimula la secreción del fluido pancreático, rico en enzimas digestivas, y la contracción de la vesícula biliar que permite la llegada de la bilis al duodeno (22, 116). La bilis facilita la digestión actuando como emulsionante principalmente de los ácidos grasos (114). Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que los ácidos biliares afectan a la digestión y asimilación de determinadas proteínas de la dieta acelerando su hidrólisis por proteasas pancreáticas (114). En la secreción pancreática aparecen cinco enzimas proteolíticas: la tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B relevantes en la digestión proteica. Estas enzimas se secretan como precursores inactivos (tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasa) y se activan en el duodeno (116). El primer paso en la activación de estos zimógenos es la activación de la tripsina mediante una enzima llamada enteroquinasa intestinal presente en las células epiteliales. Una vez activa, la tripsina actúa sobre el resto de los zimógenos generando las formas activas capaces de digerir las proteínas de la dieta a pH neutro (116). La actividad proteolítica de las enzimas pancreáticas es específica haciendo que la digestión de los polipéptidos sea realmente eficiente. Como resultado de esta digestión se generan principalmente péptidos de 6 a 8 aminoácidos y una proporción mucho menor de aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos (22, 116).

Los péptidos generados tras la actuación de las proteasas pancreáticas son hidrolizados por peptidasas asociadas al cepillo intestinal de los enterocitos. Estas peptidasas reconocen oligopéptidos de 6 a 8 aminoácidos y generan otros más pequeños de 2 a 3 aminoácidos. Durante este proceso también se forman en menor proporción aminoácidos libres (117). Los dipéptidos y tripéptidos producidos son transportados dentro de los enterocitos mediante un sistema de transporte específico presente en la membrana del cepillo intestinal: PEPT-1 (118). Sin embargo, el transporte de los diferentes aminoácidos requiere múltiples transportadores debido a las características fisicoquímicas diferentes de cada aminoácido (22). Una vez dentro de las células, los pequeños péptidos son hidrolizados por peptidasas citoplasmáticas liberando aminoácidos libres. Esta digestión intracelular es característica de proteínas ya que otros nutrientes, como los carbohidratos, se digieren completamente en el lumen (22, 119). Los aminoácidos libres son capaces de llegar a la circulación portal atravesando la membrana basolateral del enterocito mediante sistemas de transporte de aminoácidos distintos a los encontrados en el cepillo. Así se complementan los requerimientos nutricionales de aminoácidos en el ser humano. Los péptidos que escapan a la hidrólisis total por las peptidasas citoplasmáticas pueden entrar también a la circulación portal mediante un sistema de transporte peptídico en la membrana basolateral. Sin embargo, la contribución de esta ruta a la absorción total de productos proteicos de la digestión es mínima (22).

A pesar de la eficacia del duodeno en la hidrólisis de proteínas, se ha descrito que una parte de las proteínas ingeridas en la dieta pasan a lo largo del intestino delgado y llegan al intestino grueso, incluidas proteínas fácilmente absorbibles como las proteínas del huevo (120, 121). El colon se caracteriza por presentar una extensa y diversa microbiota que puede participar en el metabolismo de las proteínas que escapan a la digestión en el intestino delgado, de modo que compuestos proteicos fácilmente absorbibles pueden ser generados en el intestino grueso. Estos compuestos pueden ser aprovechados por las bacterias colónicas pero difícilmente por el hospedador debido a que el colon parece no llevar a cabo una función significativa en la absorción de aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos (122).

- **Absorción de componentes proteicos**

La absorción de los derivados peptídicos que surgen durante la digestión empieza en el duodeno, y va a ser a lo largo del intestino delgado donde se asimilan principalmente (22). Se distinguen diferentes regiones en el intestino delgado según la

capacidad de absorción de los productos proteicos, de este modo, la capacidad de absorción de dipéptidos y tripéptidos es mayor en el intestino delgado proximal, mientras que la absorción de aminoácidos es mayor en la parte distal (123). Se ha demostrado que en la región proximal, donde esta incrementada la absorción de péptidos, las peptidasas citoplasmáticas muestran mayor actividad que en la zona distal (22). Por otro lado, se ha descrito que el intestino grueso también es capaz de absorber aminoácidos y péptidos (124-127). Sin embargo, se considera que el intestino grueso sólo participa en la absorción proteica en condiciones especiales como en el período postnatal o en alteraciones intestinales (22, 128). El transportador PEPT-1 no se expresa en el colon humano en condiciones normales aunque sí en situaciones de inflamación crónica (129, 130). Además, los estudios de transporte de aminoácidos en humanos y mamíferos no muestran resultados concluyentes. Por tanto, a pesar de que en el intestino grueso existe una microbiota diversa capaz de hidrolizar restos peptídicos resistentes a las enzimas digestivas humanas, los productos de degradación de estos microorganismos podrían no ser absorbidos en el colon (22, 122).

La absorción de aminoácidos a través del epitelio intestinal está mediada por una multitud de sistemas de transporte que se expresan diferencialmente en el cepillo intestinal y en la membrana basolateral. Las proteínas se forman a partir de 20 tipos diferentes de aminoácidos con características bioquímicas diferentes. Por tanto, son necesarios transportadores específicos en función de las características del aminoácido (117). Se reconocen múltiples transportadores en la membrana del cepillo en función de estas características, como el sistema $B^{0,+}$ o $b^{0,+}$ para aminoácidos neutros y catiónicos, el sistema X^- para aminoácidos aniónicos, el sistema PAT para aminoácidos de cadena corta (glicina, alanina y prolina), el sistema IMINO para iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), etc (22). Sin embargo, el transporte de aminoácidos del enterocito a la circulación portal se realiza a través de otros transportadores diferentes. Se han descrito al menos 6 transportadores en la membrana basolateral (131). Éstos se dividen según la dependencia del Na^+ a la hora de llevar a cabo el transporte. De este modo encontramos los sistemas Na^+ dependientes (sistema A y GLYT1), los Na^+ independientes (sistemas y^+ , L y Asc) y uno que puede actuar de las dos maneras (y^+L). Parece ser que los transportadores Na^+ independientes son responsables del transporte de aminoácidos de la célula a la sangre, y en cambio los Na^+ dependientes tienen una función de nutrición celular; de modo que son responsables de la entrada de aminoácidos del torrente sanguíneo a la célula en los períodos entre comidas (131).

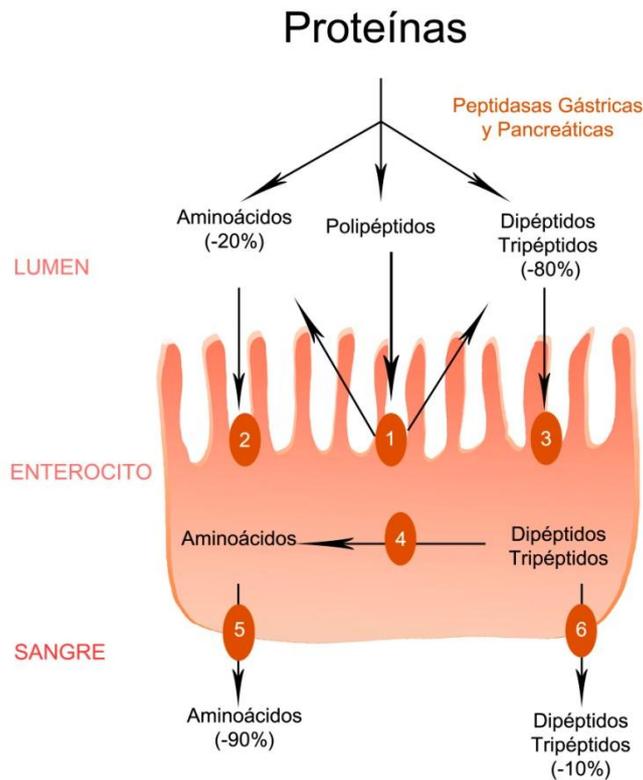


Figura 4: Modelo esquemático de los procesos de digestión y absorción en el tracto gastrointestinal. (1) Peptidasas del cepillo intestinal; (2) Transportadores de aminoácidos del cepillo intestinal; (3) Transportador PEPT de péptidos; (4) Peptidasas citoplasmáticas; (5) Transportador de aminoácidos basolateral; (6) Sistema de transporte de péptidos basolateral.

El transporte de péptidos a través de la membrana del cepillo intestinal es más importante que el de aminoácidos ya que se producen en una mayor proporción en el lumen intestinal. Existen 400 dipéptidos diferentes y alrededor de 8.000 tripéptidos derivados de la digestión (22). Curiosamente, y a diferencia de los aminoácidos, para llevar a cabo la absorción de todos los péptidos sólo existe un único transportador: PEPT-1 (118). Este transportador reconoce dipéptidos y tripéptidos, pero no péptidos más grandes ni aminoácidos libres (22). Aunque PEPT-1 aparece principalmente en el intestino delgado, donde lleva su función de absorción, también se ha detectado su presencia en el intestino grueso de mamíferos en el período postnatal y en condiciones patológicas. (129). Una vez que los péptidos entran en el enterocito, sufren un proceso proteolítico eficaz liberándose aminoácidos (22). No obstante, se sabe que hay una pequeña proporción de péptidos resistentes a la hidrólisis intestinal que aparecen de forma intacta en el suero. Este es el caso de los péptidos que

contienen prolina e hidroxiprolina, que se detectan en suero tras llevar a cabo una ingesta de gelatina (132, 133). A pesar de esta evidencia, en la actualidad se desconoce cuáles son los mecanismos por los que se lleva a cabo este transporte (134).

3.2- ¿Qué conocemos del metabolismo del gluten?

Las características físico químicas únicas del gluten hacen que la harina de trigo sea uno de los alimentos mas consumidos en todo el mundo. Se estima que la ingestión de gluten en un individuo que sigue una dieta occidental es de 10-20 g de gluten al día que es una cantidad muy elevada (7). Por tanto, resulta sorprendente que siendo un alimento tan consumido, y que a su vez genera un daño a los pacientes que padecen de EC, no se conozca en detalle el proceso metabólico que sufre en el tracto gastrointestinal humano.

- **Digestión de las proteínas del gluten**

El gluten presenta en su composición aminoacídica gran cantidad de residuos de glutamina y prolina (8). Este último aminoácido juega un papel crítico en la protección de los péptidos frente a la degradación proteolítica. Como hemos dicho anteriormente, el gluten va a ser resistente a la digestión completa por las enzimas digestivas humanas (24). Aunque está generalmente aceptado que la digestión de las proteínas ingeridas en la dieta comienza en el estómago, se ha descrito una actividad proteolítica frente al gluten en la cavidad oral. Helmershorst E *et al.* (135) detectaron proteasas de origen microbiano en la saliva capaces de hidrolizar tripéptidos que aparecían con frecuencia en las prolaminas del gluten. Además, algunas de estas proteasas degradaban péptidos del gluten resistentes a las proteasas digestivas humanas (135). Las cepas bacterianas aisladas de la placa dental con gran actividad hacia los péptidos del gluten fueron identificadas como *Rothia mucilaginosa* y *Rothia aeria*, las cuales Estas bacterias eran capaces de hidrolizar péptidos resistentes del gluten. Además, cepas bacterianas pertenecientes a *Streptococcus mitis*, *Streptococcus penumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bifidobacterium longum*, y *Bifidobacterium dentium* también fueron relacionadas con el metabolismo del gluten (136). Todo esto permite suponer que el gluten puede sufrir un proceso digestivo en la parte alta del tracto gastrointestinal por la acción de proteasas bacterianas.

A pesar de la actividad proteolítica descrita en la boca, generalmente se considera que la digestión significativa de proteínas comienza en el estómago. La proteólisis en el estómago es llevada a cabo por la pepsina y como consecuencia se generan péptidos de gran tamaño. Varios estudios realizados *in vitro* han mostrado que el estómago sólo es capaz de hidrolizar parcialmente las proteínas del gluten, de modo que polipéptidos de gluten de elevado peso molecular llegan al duodeno (25, 137).

El proceso digestivo principal de las proteínas tiene lugar en el duodeno (22). Como vimos anteriormente, los componentes de origen proteico ingeridos en la dieta, como las prolaminas del gluten, son digeridos en productos de menor tamaño al llegar al duodeno. Esta función la llevan a cabo las enzimas pancreáticas en primer lugar (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B y elastasa) y después las enzimas del cepillo intestinal. Como consecuencia de este proceso de digestión, se generan dipéptidos, tripéptidos y aminoácidos fácilmente absorbibles por los enterocitos (22). Sin embargo, estudios *in vitro* han mostrado que las prolaminas del gluten son resistentes a las enzimas pancreáticas y del cepillo intestinal (137). Aunque algunas enzimas del cepillo intestinal como la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), dipeptidil carboxipeptidasa 1 (DCP1) y la aminopeptidasa N (AMN) son capaces de hidrolizar péptidos con residuos de prolina, estas enzimas no digieren completamente las proteínas del gluten. Se ha demostrado que péptidos inmunoestimuladores como el p57-68 son parcialmente degradados en la membrana apical de los enterocitos. Sin embargo, esto no ocurre con otros péptidos como el 33-mer (138-140). La capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos en los que participan residuos de prolina se produce, entre otras, por la actividad prolilendopeptidásica, y las enzimas proteolíticas presentes en el tubo digestivo humano carecen de esta actividad (24, 25, 141). Por tanto, las proteínas del gluten van a ser resistentes a la digestión completa por las enzimas digestivas humanas, generándose en el intestino delgado péptidos relativamente grandes ricos en prolina y glutamina. Algunos de estos péptidos van a tener un carácter tóxico para individuos susceptibles generando los procesos inflamatorios característicos de la EC (24, 25). Por otro lado, hay motivos para pensar que la microbiota duodenal puede tener un papel importante en el metabolismo del gluten. Aunque hay una menor diversidad microbiana en el intestino delgado con respecto al intestino grueso, la elevada concentración de proteínas en el lumen puede hacer que proliferen bacterias proteolíticas (122). Además, la gran ingesta de gluten en la dieta, junto con la resistencia de sus proteínas a las enzimas digestivas humanas, hace que péptidos del gluten permanezcan en el intestino delgado y puedan ser

utilizadas como sustrato por las bacterias duodenales. De hecho, han sido descritas proteasas microbianas capaces de hidrolizar gluten en la mucosa duodenal. Sin embargo, estas proteasas sólo aparecen en pacientes con EC (142).

Como ocurre con otras proteínas, el gluten parcialmente digerido pasa a lo largo del intestino delgado llegando al intestino grueso (120, 143). En esta región del tubo digestivo hay presente una extensa y diversa microbiota en la que se encuentran diferentes bacterias proteolíticas. La diversidad genética de la microbiota en el intestino grueso produce diversas enzimas y rutas bioquímicas que son distintas a las que se encuentran en el hospedador. De modo que las proteasas bacterianas pueden llevar a cabo una digestión de los péptidos del gluten resistentes a las enzimas digestivas. (144). Se han aislado cepas bacterianas de *Bifidobacterium* como *Bifidobacterium longum* CECT 7347, *Bifidobacterium animalis* IATA-A2 o *Bifidobacterium bifidum* IATA-ES2, así como cepas de *Bacteroides fragilis*, que podrían llevar a cabo la hidrólisis de péptidos del gluten (110, 145, 146). Sin embargo, la detección de gluten parcialmente digerido en las muestras fecales de sanos y enfermos celíacos demuestra que, al menos una parte del gluten consumido en la dieta, es capaz de atravesar el tracto digestivo para ser excretado por las heces (143).

- **Transporte de péptidos del gluten**

Como vimos anteriormente, los derivados proteicos generados en el proceso de digestión se transportan del lumen al enterocito en forma de dipéptidos y tripéptidos (22). Incluso hay evidencias de que algunos tetrapéptidos también pueden ser absorbidos a través de la membrana del cepillo. Sin embargo, péptidos de mayor tamaño no son transportados por PEPT-1 (147-149). Durante la digestión del gluten se generan péptidos muy grandes (10-30 residuos de aminoácidos), con alto carácter inmunogénico, que no pueden atravesar el epitelio de la mucosa (25). Curiosamente, Matysiak-Budnik T *et al.* (138) demostraron que péptidos inmunotóxicos del gluten, como el 33-mer, aparecían dentro de los enterocitos donde podrían ser degradados. Una de las actividades enzimáticas que parecía participar en este proceso de digestión intracelular de gliadina era la PEP. Sin embargo, se ha observado que esta enzima no es capaz de hidrolizar el péptido 33-mer completamente en humanos (150, 151). Por tanto, los péptidos del gluten pueden atravesar la barrera intestinal independientemente de la PEPT-1. Se ha descrito que pequeñas cantidades de proteínas intactas o parcialmente digeridas son capaces de atravesar el epitelio intestinal en humanos. Este es un proceso fisiológico que se requiere para la

presentación antigénica de las células linfoides. Sin embargo, este proceso parece ser poco significativo nutricionalmente (152). Por tanto, aunque el epitelio intestinal forma una barrera eficiente para alimentos no digeridos o microorganismos, la entrada de determinados componentes presentes en el lumen, como proteínas parcialmente digeridas, puede llevarse a cabo mediante la permeabilidad paracelular y el transporte transcelular (151).

Permeabilidad paracelular. Consiste en la transferencia de sustancias del lumen, a través del epitelio intestinal, mediante las uniones fuertes entre células o *tightjunctions* (TJs) (151). Las TJs están formadas por un conjunto de moléculas estructurales y reguladoras que controla su plasticidad y permeabilidad. Las TJs forman pequeños poros en las vellosidades del epitelio ($4-9 \times 10^{-8}$ cm) y poros mayores en las criptas ($50-60 \times 10^{-8}$ cm) (153). El transporte paracelular controla el paso de iones y moléculas pequeñas de hasta 600 Da (151). Sin embargo, los péptidos generados tras la digestión parcial del gluten en el lumen intestinal son de mayor tamaño. Además, no hay estudios que demuestren el paso de péptidos del gluten mediante este transporte (154). Por tanto, no parece que la permeabilidad paracelular participe en el transporte de péptidos del gluten a través del epitelio intestinal.

Transporte transcelular o transcitosis. Consiste en la transferencia de moléculas antigénicas a través del epitelio mediante la formación de vesículas. Esta ruta es importante para antígenos microbianos, pero no parece esencial para proteínas de la dieta. La transcitosis implica una combinación entre los procesos de endocitosis, degradación dentro del compartimento endolisosomal y exocitosis (154). La liberación en la lámina propia es un 90% de aminoácidos libres y restos peptídicos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad; y un 10% de proteínas intactas. Los péptidos pueden ser tomados por las células dendríticas de la mucosa y migrar por la vía linfática para la presentación antigénica (151). Varios trabajos han demostrado que los péptidos del gluten pueden atravesar la barrera intestinal a través del transporte transcelular. Mediante este proceso parece ser que se lleva a cabo la digestión intracelular de los péptidos del gluten descritos por Matysiak-Budnik T *et al.* (138).

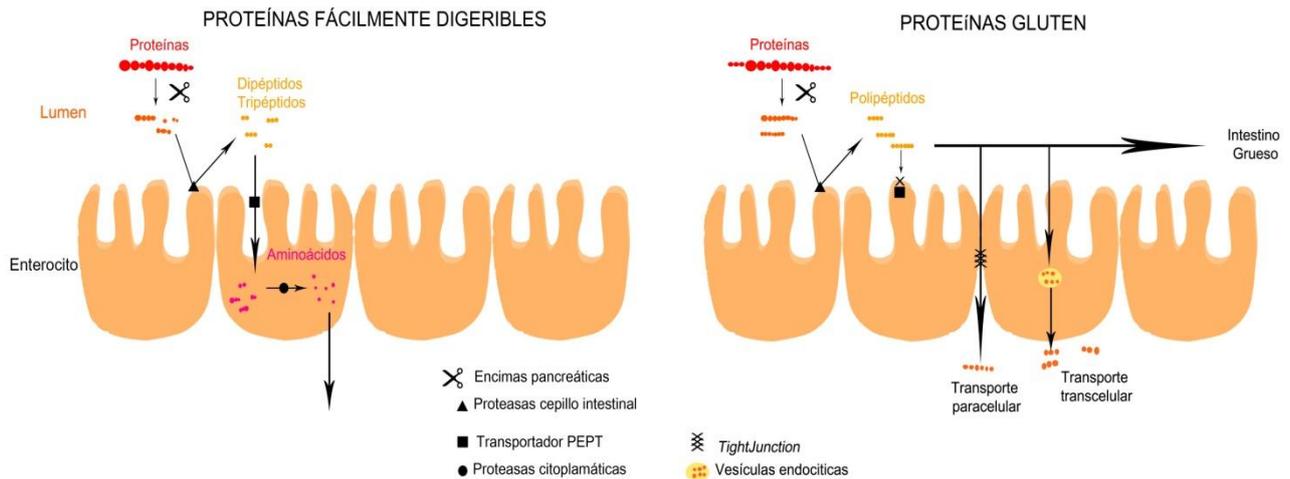


Figura 5: Modelo esquemático comparado entre el metabolismo de proteínas fácilmente digeribles y proteínas del gluten. Las proteínas fácilmente digeribles son hidrolizadas a aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos por las proteasas pancreáticas y del cepillo intestinal. Estos restos peptídicos entran al enterocito donde son hidrolizados casi por completo a aminoácidos. El producto final de la digestión llega al torrente sanguíneo. En cambio las proteínas del gluten son resistentes a la digestión en el lumen intestinal, de modo que se generan grandes péptidos de gluten que no pueden ser transportados por el transportador PEPT. Una pequeña proporción de los restos polipéptidos generados pueden llegar a la lámina propia a través del transporte paracelular y transcelular. El resto atravesarán el intestino delgado hasta llegar al intestino grueso.

3.3- Diferencias en el metabolismo del gluten entre sanos y pacientes con enfermedad celiaca

El gluten tiene un efecto tóxico para los pacientes que sufren de EC. Sin embargo, no se conoce en detalle el proceso metabólico que sigue el gluten en pacientes con EC. Hay estudios que sugieren que el metabolismo del gluten en pacientes celiacos puede ser diferente con respecto a las personas sanas. Por ejemplo, algunos trabajos muestran que los pacientes celiacos pueden presentar una alteración en la actividad de proteasas del cepillo intestinal, se han descrito proteasas bacterianas en el duodeno de pacientes celiacos que no aparecían en sanos y los pacientes celiacos muestran un incremento en la permeabilidad intestinal. Sin embargo, no se ha llegado a la conclusión de si estas diferencias son causa o consecuencia de la aparición de la enteropatía (142, 151).

- **Digestión de péptidos del gluten**

Las proteínas del gluten son resistentes a las enzimas digestivas humanas independientemente de la aparición de la EC. Sin embargo, durante mucho tiempo se especuló con la posibilidad de que los pacientes celíacos podrían llevar a cabo una digestión anómala de las proteínas del gluten. La primera hipótesis propuesta para explicar la EC fue la hipótesis metabólica o de la peptidasa perdida, que se basaba en una deficiencia enzimática en el borde del cepillo intestinal de los pacientes celíacos con respecto a sanos. Según esta hipótesis, la deficiencia enzimática sería la causante de una degradación incompleta del gluten en pacientes celíacos que facilitaría su efecto tóxico (155). Pese a que esta teoría ha sido actualmente descartada como posible causa de la EC, hay varios trabajos que describen una reducción en la actividad de peptidasas que reconocen residuos de prolina en pacientes celíacos (155, 156). Se han realizado estudios *in vitro* con homogenizados de biopsia que han mostrado una baja digestión de gliadina por parte de las biopsias de pacientes con EC (138). Sin embargo, en estos estudios no se encontraban diferencias cualitativas en los péptidos generados. (157). El descenso en la capacidad de digestión se asoció a una reducción en la actividad de peptidasas del cepillo intestinal como la AMN, DPPIV, glicil leucina dipeptidasa, prolil dipeptidasa y γ glutamil transpeptidasa (158, 159). No obstante, muchas de estas actividades enzimáticas se recuperaban en pacientes celíacos tratados (158). Por tanto, las diferencias observadas se consideraron un efecto secundario que se podía deber a la arquitectura duodenal patogénica asociada a la EC. Actualmente se considera que la digestión del gluten es incompleta en cualquier persona y que la EC no se debe a la presencia de péptidos tóxicos, sino a una respuesta anómala frente a estos (25).

Se ha sugerido que un posible defecto en las peptidasas DPPIV y AMN también podrían participar en el proceso patológico de la EC. Estas actividades enzimáticas son capaces de hidrolizar péptidos que presentan residuos de prolina en su secuencia. Además, un estudio *in vivo* en el intestino de ratas mostró que la enzima DPPIV intestinal permite una mayor asimilación de péptidos ricos en prolina (141). Sin embargo, estudios genéticos no muestran una asociación clara entre la EC y los genes que codifican para estas enzimas. Aunque se encontró una asociación en pacientes británicos e irlandeses para la AMN, en pacientes italianos no aparecía ninguna relación entre la EC y las actividades DPPIV y AMN1 (160-162). También existe controversia entre la recuperación de estas dos actividades enzimáticas en celíacos tratados (157, 158, 163, 164). Con todo esto, resulta difícil concluir si la DPPIV o la AMN tienen un papel importante en el desarrollo de la EC (151).

Además de las enzimas digestivas humanas, se ha especulado que las bacterias intestinales también podrían participar en el metabolismo del gluten. Numerosos trabajos han descrito un desequilibrio en la composición y la actividad funcional de la microbiota intestinal de pacientes celíacos con respecto a sano (85, 86, 89, 165). Incluso se ha sugerido que las bacterias proteolíticas podrían participar en el proceso patológico de la EC. Bernardo D *et al.* (142) mostraron un patrón de proteasas, de origen bacteriano, capaces de hidrolizar gliadina, que aparecía en la mucosa duodenal de pacientes celíacos pero no en la de sanos. Según este trabajo, las bacterias proteolíticas presentes en el duodeno de pacientes celíacos podrían llevar a cabo una digestión del gluten diferente que la microbiota intestinal de voluntarios sanos. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo en esta dirección

- **Transporte de péptidos del gluten**

La permeabilidad intestinal aparece alterada en muchas patologías digestivas, y la EC no es una excepción (151). En pacientes con EC, la atrofia vellositaria y el incremento de las criptas generan un aumento de la permeabilidad intestinal que se mantiene en celíacos con atrofia vellositaria parcial, pero desaparece con la restauración histológica del duodeno (166, 167). Estudios en humanos y en animales mostraron que esta alteración de la permeabilidad intestinal implica un incremento en la absorción de grandes péptidos derivados del gluten en pacientes celíacos y animales sensibles al gluten (168-170).

Permeabilidad paracelular: Se ha propuesto que las TJs que controlan el transporte paracelular podrían regular el paso de péptidos y proteínas provenientes de la dieta a través del epitelio intestinal (152). Pacientes con EC activa muestran una permeabilidad paracelular incrementada con respecto a individuos sanos (151, 171). Este incremento de la permeabilidad se puede deber a un mayor tamaño de poro debido a una expresión alterada de las proteínas estructurales (151). En pacientes celíacos se ha detectado una alteración estructural de las TJs en biopsias duodenales, así como una reducción en la expresión de ZO-1, un marcador de integridad de TJs (172, 173). Además, se ha descrito que en niños celíacos hay un aumento en la expresión de la Claudina 2, que incrementa la porosidad de las TJs, y de la Claudina 3 que promueve la pérdida de tensión entre las uniones (174). Por otro lado aparece una asociación genética entre la EC y las regiones que codifican para proteínas de TJs como PARD-3, MAGI-2 y MYO9B (175, 176).

Fasano A *et al.* (105, 177), establecieron una hipótesis basándose en el descubrimiento de la zonulina, una proteína presente en el intestino de mamíferos y análoga a la toxina zónula ocludens (ZOT) perteneciente a la especie *Vibrio cholerae*. Está descrito que la toxina ZOT es capaz de debilitar las uniones TJs. Según esta hipótesis, la zonulina podría incrementar la permeabilidad paracelular en pacientes celíacos permitiendo la entrada de los péptidos tóxicos del gluten en la submucosa y generando el proceso inmunopatológico. Estudios en animales demostraron que la zonulina reducía la resistencia eléctrica del yeyuno y del íleon (178). Aunque estos estudios son de interés, sólo se ha demostrado el paso de iones y pequeñas moléculas (100-300 Da) a través de este tipo de transporte. Los péptidos tóxicos de gliadina presentan un tamaño mucho mayor y las TJ son sensibles a la carga y al tamaño de las moléculas, por lo que los análisis de permeabilidad podrían no ser válidos para los péptidos de gliadina (151).

Transporte transcelular: A diferencia de la permeabilidad paracelular, se ha demostrado que los péptidos de gliadina pueden atravesar la barrera intestinal mediante el transporte transcelular (151). Trabajos llevados a cabo en cultivos celulares han mostrado que péptidos inmunotóxicos como el 33-mer pueden aparecer en vesículas endocíticas dentro de la célula sufriendo una degradación parcial (179). Además, el proceso de transcitosis de péptidos de gliadina en cultivos celulares se incrementaba al ser tratado con interferón γ , una citoquina proinflamatoria producida en exceso en la mucosa de pacientes celíacos (180). Esto parece indicar que la permeabilidad transcelular podría estar aumentada en pacientes celíacos. Estudios en animales, realizados en macacos sanos y con intolerancia al gluten, mostraron que los especímenes intolerantes presentaban el péptido 33-mer intacto en la lámina propia y en el suero después de 60 minutos, a diferencia de los macacos sanos donde sólo se detectaba en el cepillo intestinal (168, 170).

En humanos aparecen resultados similares a los descritos anteriormente. Se detectó que péptidos del gluten aparecían en vesículas endocíticas, endosomas tardíos y en vesículas con HLA-DR dentro de las células epiteliales de pacientes celíacos (181). Además, se observó una mayor entrada del péptido 33-mer en pacientes celíacos activos que en celíacos tratados e individuos control (179). Un estudio comparativo entre biopsias de sanos, celíacos activos y celíacos tratados, llevado a cabo con los péptidos 33-mer y 19 mer, mostró que las muestras control y las muestras de celíacos tratados eran capaces de degradar casi completamente estos péptidos durante el transporte. Sin embargo, esto no ocurría en las biopsias de los pacientes celíacos activos (138). Matysiak-Budnik T *et al.* (138), relacionaron este

transporte anormal con el receptor CD71 el cual es capaz de unirse a la inmunoglobulina A1 (Ig A1). Esta Ig A1 se caracteriza porque es capaz de reconocer y unirse a péptidos del gluten. En la mucosa intestinal de sanos el receptor CD71 sólo se expresa en la membrana basolateral del enterocito y principalmente en las criptas. Sin embargo, en pacientes celiacos está masivamente y ectópicamente expresado en las vellosidades del enterocito debido probablemente a que CD71 es un receptor para la transferrina, y la deficiencia en hierro es frecuente en EC (182, 183). La unión del receptor CD71 al complejo IgA1-gluten permite la entrada del péptido del gluten al enterocito y su transporte por transcitosi. Además, la formación de este complejo podría proteger al péptido del gluten de la degradación dentro de la vesícula llegando intacto a la lámina propia (151).

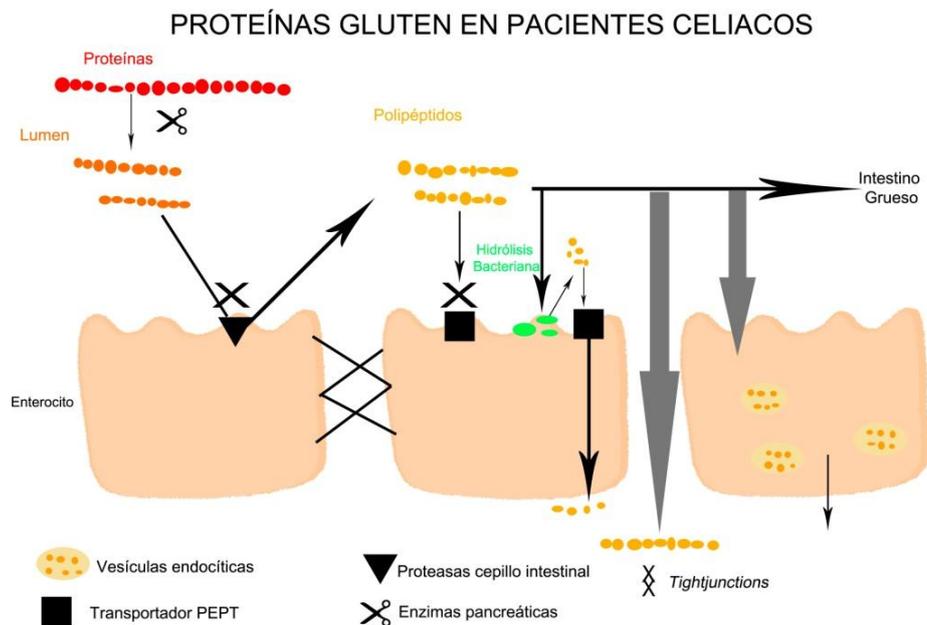


Figura 6: Modelo hipotético del metabolismo del gluten en pacientes celiacos. La deficiencia en las enzimas del cepillo intestinal genera grandes péptidos de gluten que no son reconocidos por el transportador PEPT. Estos péptidos permanecen en el lumen intestinal donde pueden ser hidrolizados por las proteasas bacterianas, descritas en el duodeno pacientes celiacos, generando compuestos fácilmente absorbibles. Los pacientes celiacos presentan también un aumento de la permeabilidad intestinal que podría permitir la entrada de una gran cantidad de péptidos del gluten a través de los enterocitos mediante el transporte paracelular y transcelular.

Aunque el aumento de la permeabilidad intestinal en pacientes celíacos parece evidente, hay controversia a la hora de discernir si esta permeabilidad causa la EC o se produce como consecuencia de ella (151). Los estudios a nivel genético llevados a cabo hasta ahora no muestran asociaciones concluyentes entre la EC y los genes reguladores de la permeabilidad intestinal. Se especula que otros factores ambientales diferentes al gluten, como las infecciones víricas o un desequilibrio en la microbiota del tubo digestivo, pueden tener un papel importante (184, 185). Por ejemplo, se ha descrito que infecciones intestinales de origen vírico pueden estimular la producción de citoquinas inflamatorias e inducir lesiones epiteliales, generando un incremento de la permeabilidad intestinal (83). Así mismo, Cinova J *et al.* (111) demostraron que bacterias intestinales presentes en pacientes celíacos podían afectar a la integridad intestinal produciendo también un incremento de la permeabilidad. Sin embargo, hay pocos estudios llevados a cabo en este campo.

4- La microbiota intestinal

4.1- Composición y desarrollo de la microbiota intestinal

La mayoría de los animales coexisten con una comunidad microbiana que aporta al animal hospedador múltiples beneficios fisiológicos, en una auténtica relación de simbiosis (186). El término “microbiota” hace referencia a la comunidad de microorganismos reunidos en un nicho ecológico determinado (187). El número de bacterias presentes en el cuerpo humano es muy extenso y variable. La microbiota humana consiste en aproximadamente 10^{14} células bacterianas que se estima que son 10 veces superiores a las células eucariotas de humanos. Estas células bacterianas llevan asociada una tremenda información genética mucho mayor a la presente en nuestro genoma. Por tanto, la microbiota del individuo es relevante en nuestro funcionamiento “normal” o predisposición a padecer algunas enfermedades (188).

En humanos, la interacción entre células animales y bacterianas es especialmente importante en el tracto gastrointestinal (186). Se estima que puede haber unas 2.000 especies de bacterias comensales en nuestro cuerpo, de las cuales, la inmensa mayoría se encuentran en el intestino. La mucosa del tracto gastrointestinal es la segunda superficie más extensa del organismo (250 m^2) y constituye la principal zona de contacto frente a agentes externos. La microbiota colónica, que es la más diversa de todo el tracto digestivo, constituye un complejo ecosistema integrado por

más de 500 especies bacterianas cultivadas que pertenecen a más de 200 géneros. Sin embargo, la gran mayoría de las especies del intestino humano pertenecen a bacterias no cultivadas y nuevas especies (189). El ecosistema microbiano del tracto gastrointestinal incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto y una serie de microorganismos que transitan temporalmente por el tubo digestivo (187). El primer grupo se distribuye de forma diferente según las características anatómicas y fisiológicas de cada región intestinal (186, 190). De este modo, la densidad microbiana va aumentando a medida que descendemos por el tracto gastrointestinal. El estómago, a consecuencia de su pH ácido, tradicionalmente se ha considerado que presenta una carga bacteriana limitada (191). En el intestino delgado es donde comienza a aparecer una microbiota estable. 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 (192). La mayor concentración de bacterias se encuentra en el intestino grueso, donde los recuentos de bacterias alcanzan densidades de alrededor 10^{12} UFC/g de heces. Los factores que facilitan el desarrollo bacteriano son la elevación del pH (próximo a la neutralidad), la disminución de las sales biliares y de los restos de secreción pancreática. Además, en el colon el tiempo de tránsito es más lento lo que brinda a los microorganismos la oportunidad de proliferar fermentando los sustratos disponibles derivados de la dieta (193, 194).

- **Desarrollo de la microbiota**

La microbiota intestinal es característica de cada persona. La adquisición de esta microbiota comienza en el momento del nacimiento y se va consolidando a lo largo de la vida del individuo, de modo que el feto y el recién nacido se consideran libres de bacterias. Sin embargo, se encuentran pequeñas cantidades de microorganismos inmediatamente después del nacimiento. Las bacterias frecuentemente aisladas son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium*. La colonización inicial del intestino del niño ocurre durante el parto, al ponerse en contacto el bebé con la microbiota vaginal de su madre, y posteriormente por el contacto con la microbiota normal de sus padres (195). 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

período de lactancia (190). El desarrollo de una comunidad bacteriana estable depende de múltiples factores intrínsecos como las condiciones de pH, secreciones pancreáticas, sales biliares, etc; y extrínsecos tales como la alimentación, el clima, historial clínico, etc (186, 196). Dentro de ellos, la dieta se yergue como el factor ambiental más relevante, ya que cualquier nutriente ingerido en la dieta que llegue al intestino se convierte en sustrato para las bacterias (197). Se considera que una persona alcanza una microbiota estable una vez finalizada la lactancia y tras iniciarse de manera continuada una alimentación sólida (186).

- **Composición de la microbiota**

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 (187). La presencia específica de los microorganismos depende de las características fisiológicas y morfológicas de cada parte del aparato digestivo. Por tanto, vamos a encontrar diferentes especies bacterianas a lo largo del tubo digestivo (186). Así, los grupos más frecuentemente encontrados en el esófago pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella* (198). En cambio, el estómago presenta una carga bacteriana limitada debido a las condiciones adversas que aparecen en esta región. Bik EM *et al.* (191) determinaron que bacterias de los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* aparecían con frecuencia en el estómago. Además, destaca la presencia de *Helicobacter pylori* como miembro de la microbiota indígena del estómago, el cual se ha considerado frecuentemente un microorganismo patógeno causante de enfermedades. Sin embargo, se ha demostrado que puede ejercer un papel protector sobre el huésped (199, 200).

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 ellos han sido realizados a partir de muestras del duodeno, donde se ha 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 trabajos 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 (201, 202). La mayoría de los microorganismos aislados eran especies ácido-tolerantes (principalmente *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp.) derivadas de las cavidades orales y nasales; aunque

también se aislaron, en menor proporción, *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Veillonella* spp., *Staphylococcus* spp., enterobacterias y levaduras (203). Nistal E *et al.* (89), mediante técnicas moleculares, mostraron que la mayoría de las bacterias del duodeno pertenecían a *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*; y los géneros más representativos eran *Streptococcus* y *Prevotella*. En el yeyuno e íleon se ha observado un predominio de microorganismos aerobios Gram-negativos, y en menor proporción de anaerobios obligados (187). Wang EM *et al.* (204), mediante la construcción de colecciones de clones del ADNr 16S, mostraron la presencia de *Bacteroides* y *Clostridium* como las especies dominantes en biopsias procedentes de la mucosa del íleon. Por otro lado, en un estudio posterior, se determinó que *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y representantes del filo *Proteobacteria*, aparecían frecuentemente en biopsias procedentes del yeyuno (205).

Se sabe que en el colon existe un ambiente reductor desprovisto de oxígeno, por lo que la mayoría de las poblaciones que han sido identificadas son anaerobias estrictas. Dentro de esta microbiota, el género *Bacteroides* (constituído por bacilos Gram-negativos no esporulados) es uno de los más abundantes (206). Además, también son dominantes otros microorganismos Gram-positivos no esporulados pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* (207). 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 (207, 208).

4.2- Funciones de la microbiota intestinal

Los microorganismos que viven en el intestino interactúan con las células del hospedador ejerciendo una influencia vital en el correcto desarrollo bioquímico y fisiológico del organismo que colonizan. Esta interacción es una auténtica relación de mutualismo en la que ambas partes se ven beneficiadas (209, 210). Entre las funciones importantes para el hospedador en las que interviene la microbiota intestinal deben incluirse no sólo la metabólica y protectora, de las que se hablará en profundidad más adelante, sino también otras menos conocidas como la de contribuir a la maduración del tracto gastrointestinal, participar en la regulación de la

permeabilidad paracelular, regular la angiogénesis, la deposición de grasas, etc (211-213).

- **Funciones metabólicas**

Muchos alimentos ingeridos en la dieta no son capaces de ser digeridos por las enzimas digestivas del tracto digestivo. El metabolismo microbiano es responsable de la conversión de muchas de estas sustancias en nutrientes que pueden ser absorbidos y utilizados por el huésped (214). Está ampliamente demostrada la importancia de la microbiota intestinal en el metabolismo de carbohidratos de difícil digestión (215). La diversidad genética de la microbiota intestinal produce diversas enzimas y rutas bioquímicas que son distintas a las que se encuentran en el hospedador, permitiendo así la recuperación de parte de la energía ingerida con la comida. Además, las bacterias también intervienen en otras funciones metabólicas como la producción de vitaminas (K, B₁₂, biotina, ácido fólico y pantoténico), el control de los niveles de colesterol en sangre, la absorción de determinadas sales minerales, la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea, etc., todas ellas de gran importancia para el hospedador (214).

La microbiota diversa presente en el colon participa en la fermentación de los alimentos que no han sido previamente digeridos por nuestras enzimas. Los productos metabólicos más importantes que se generan, como consecuencia de estas fermentaciones, son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), especialmente acético, propiónico y butírico (197). Estos AGCC son los principales aniones que surgen de la fermentación bacteriana de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, péptidos y glucopéptidos en el colon (216). Aunque en términos cuantitativos los carbohidratos de origen vegetal son los precursores más importantes, los restos proteicos que llegan al intestino también se utilizan en la producción de AGCC y específicamente en los AGCC ramificados (217, 218). 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 (218, 219). Por otro lado, el acético y el propiónico acceden a la circulación portal y participan en el metabolismo del colesterol y los lípidos (218, 219). 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 (220). Por el contrario, el acético reduce los niveles

séricos de ácidos grasos, aunque aumenta los de colesterol (221). Se considera que la microbiota intestinal puede contribuir a reducir la colesterolemia mediante su capacidad para modular el equilibrio y composición entre estos AGCC. Además se ha descrito que 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 la entrada por difusión pasiva (221).

Además de alimentos, en la dieta se ingieren otras sustancias como aditivos, fármacos o contaminantes que son absorbidos y llegan al hígado, a través de la circulación sanguínea, donde son detoxificados por procesos de oxidación y conjugación. Aunque la mayoría de estas sustancias son eliminadas por la orina, una pequeña proporción vuelve a ser excretada al lumen intestinal, vía bilis, donde se encuentra con la microbiota presente en el intestino. Muchas de estas sustancias son desconjugadas y detoxificadas por bacterias del intestino, permitiendo así su vuelta al torrente sanguíneo (222). Sin embargo, la actividad metabólica de la microbiota intestinal también puede producir un daño en el organismo. Así, el metabolismo anaeróbico de los péptidos y proteínas a nivel del intestino generan una serie de sustancias potencialmente tóxicas como amonio, aminas, fenoles, tioles e indoles (214, 223)

- **Funciones de protección**

Una de las funciones más importantes de la microbiota humana es la regulación y estabilización del ecosistema interno evitando la colonización por parte de otros microorganismos patógenos. Existe un fenómeno de competición entre los microorganismos ya instaurados y los microorganismos patógenos por los nutrientes y el espacio disponible. Además, la microbiota intestinal da lugar a unas condiciones de pH, producción de bacteriocinas, etc., que dificultan de forma importante la colonización por un elemento extraño a esta microbiota (224, 225). Por tanto, la microbiota humana constituye la primera barrera de defensa frente a las infecciones, de modo que, un desequilibrio en el ecosistema microbiano puede acarrear la invasión del espacio por bacterias dañinas (225).

Otra función protectora esencial de la microbiota humana es la de desarrollar el sistema inmunitario (226, 227). Los estudios con animales gnotobióticos (libres de

bacterias) 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, una baja concentración de inmunoglobulinas circulantes en la sangre, etc (206, 228). 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 (229). 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 (230).

4.3- Bacterias proteolíticas en el tracto digestivo: ¿Degradación microbiana del gluten?

Las proteasas bacterianas presentes en el tracto digestivo contribuyen a procesos fisiológicos importantes del hospedador. Probablemente su función más conocida es la metabólica. Los microorganismos producen diversas enzimas y rutas bioquímicas distintas a las que se encuentran en el huésped, permitiendo así el aprovechamiento de alimentos ingeridos en la dieta que no podrían ser aprovechados por las células del hospedador (231). Las bacterias proteolíticas también tienen funciones defensivas activando factores de crecimiento y citoquinas, y funciones estructurales tales como la recuperación de la matriz celular (231). Sin embargo, la microbiota proteolítica puede presentar actividades potencialmente dañinas para el organismo. Por ejemplo, el metabolismo anaeróbico de los péptidos y proteínas a nivel del intestino genera una serie de sustancias potencialmente tóxicas como amonio, aminos, fenoles, tioles e indoles (144, 223). Además, la activación anómala de receptores en el hospedador, la degradación excesiva de la matriz extracelular, el desequilibrio en la barrera intestinal y la invasión de bacterias patogénicas puede producirse por proteasas bacterianas (231, 232).

Las bacterias del tracto digestivo tienen una función importante en el metabolismo de alimentos de difícil digestión para el hospedador. Precisamente, las prolaminas del gluten no son capaces de ser hidrolizadas completamente por las enzimas digestivas humanas, de modo que permanecen en el lumen intestinal donde pueden ser sustrato de las bacterias proteolíticas del tracto digestivo. Se ha especulado que la digestión del gluten podría comenzar en la cavidad oral debido a

que la boca presenta una actividad proteolítica frente al gluten (135). Así, en un estudio realizado por Helmershorst E *et al.* (135) se detectaron proteasas de origen microbiano en la saliva capaces de reconocer tripéptidos que aparecían con frecuencia en las prolaminas del gluten. Además, algunas de estas proteasas hidrolizaban péptidos del gluten resistentes a las enzimas digestivas humanas (135). Las cepas bacterianas aisladas de la placa dental con gran actividad hacia los péptidos del gluten fueron identificadas como *Rothia mucilaginosa* y *Rothia aeria*. Dichas cepas eran capaces de hidrolizar al 50% una concentración de 250 µg/ml de gluten en 30 minutos. A su vez, estos microorganismos hidrolizaron péptidos inmunogénicos del gluten que no habían sido digeridos por las proteasas digestivas humanas. Se demostró también que las proteasas de *Rothia aeria* eran capaces de resistir el pH ácido del estómago, reactivándose a pH neutro, de modo que esta cepa bacteriana podría atravesar el estómago y llegar al duodeno donde puede tener un papel importante en la digestión del gluten (136). Precisamente, especies de *Rothia* han sido asociadas a la microbiota duodenal (89, 233). En el estudio llevado a cabo por Helmerhorst E *et al.* (135) también se aislaron otras cepas bacterianas pertenecientes a *Streptococcus mitis*, *Streptococcus penumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bifidobacterium longum*, y *Bifidobacterium dentium* que podrían estar relacionadas con el metabolismo del gluten (136). Todos estos estudios sugieren que el gluten puede sufrir un proceso digestivo en la parte alta del tracto gastrointestinal llevado a cabo por la acción de proteasas bacterianas.

Aunque no se ha demostrado *in vivo*, hay varias razones para considerar que la microbiota intestinal puede tener un papel importante en el metabolismo de proteínas (122). Las proteínas y péptidos de la dieta pueden proporcionar aminoácidos a las bacterias del intestino delgado que éstas utilizan para su propia síntesis proteica, la generación de energía metabólica y el reciclaje de cofactores reducidos. A su vez, los compuestos metabólicos generados por las bacterias pueden ser utilizados por el hospedador. Por ejemplo, la microbiota es capaz de proporcionar aminoácidos al hospedador para la síntesis de proteínas (122). A pesar de que la concentración y diversidad bacteriana en el intestino delgado es menor que la presente en el intestino grueso, el intestino delgado muestra una concentración luminal de proteínas elevada que puede permitir la proliferación de bacterias proteolíticas (122). Además, la ubicuidad del gluten en la dieta y la resistencia de las prolaminas del gluten a las enzimas digestivas humanas permiten que aparezcan péptidos del gluten de gran tamaño en el duodeno. Estos péptidos pueden ser utilizados como sustrato por las bacterias intestinales, de hecho, se ha demostrado que la retirada de gluten en la dieta

puede afectar a la población bacteriana duodenal (89). En un estudio reciente se han aislado bacterias duodenales capaces de crecer en medios con gluten como única fuente de nitrógeno. La mayoría de las bacterias aisladas pertenecían al género *Streptococcus*. Además, también aparecieron especies como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis* con actividad proteolítica frente al gluten (234). La presencia de proteasas microbianas capaces de hidrolizar el gluten en el duodeno también ha sido descrita. Sin embargo, estas proteasas se restringían a la mucosa duodenal de pacientes celíacos (142). Por tanto, estos resultados parecen indicar que la microbiota intestinal puede participar en el metabolismo del gluten.

A pesar de la eficiente capacidad proteolítica del intestino delgado, péptidos y proteínas no digeridos llegan al intestino grueso. Se sabe que el intestino grueso presenta una extensa y diversa microbiota capaz de utilizar los componentes dietéticos que escapan a la digestión en el estómago e intestino delgado (122), de modo que la composición de la microbiota se encuentra muy influenciada por la dieta (235). Se cree que una cantidad aproximada de 13 g de proteína entra al intestino grueso diariamente y pasa a disposición de la microbiota del colon, que la emplea para su metabolismo. Sin embargo, hay un escaso conocimiento de la digestión de proteínas y péptidos en el intestino grueso. Las principales bacterias proteolíticas del colon se atribuyen a los géneros *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Staphylococcus* (223). Estas bacterias producen enzimas y rutas metabólicas diferentes a las del hospedador, que permiten la recuperación de parte de la energía consumida en la dieta. Por tanto, proteínas resistentes a las enzimas digestivas humanas, como las proteínas del gluten, pueden ser utilizadas por las bacterias residentes en el intestino grueso. La retirada de gluten en la dieta puede afectar a las comunidades bacterianas del colon. De Palma G *et al.* (236) observaron una reducción en la población de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, así como un incremento de las enterobacterias, cuando voluntarios sanos llevaban a cabo una dieta sin gluten. Resultados similares fueron obtenidos en estudios con celíacos; donde los pacientes celíacos tratados también presentaban un desequilibrio en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* con respecto a los pacientes celíacos activos (72). En un estudio llevado a cabo por Laparra M *et al.* (146) se observó que cepas bacterianas de *Bifidobacterium* aisladas de las heces, como *B. animalis* IATA-A2, *B. bifidum* IATAES2 y *B. longum* CECT 7347, eran capaces de hidrolizar péptidos de gliadina. Además, dicha cepa (*B. longum* CECT 7347) resultó ser eficaz a la hora de digerir el péptido 33-mer, péptido que como se mencionó anteriormente, es resistente a las enzimas digestivas humanas (72, 110). Por otro lado, se ha descrito que cepas fecales de

Bacteriodes fragilis también muestran actividad proteolítica frente a las proteínas del gluten (145, 237). Estos datos parecen indicar que *Bifidobacterium* y *Bacteroides* podrían participar en el metabolismo del gluten en el intestino grueso.

Tabla 3: Microorganismos autóctonos del tracto digestivo y microorganismos capaces de participar en el metabolismo del gluten.

Tracto Digestivo	UFC/g contenido intestinal	Bacterias autóctonas	Bacterias que utilizan péptidos de gluten
Boca y esófago	10^4 - 10^6	<i>Streptococcus</i> <i>Prevotella</i> <i>Veillonella</i>	<i>Rothia aeria</i> / <i>R. mucilaginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus mitis</i> / <i>S. pneumoniae</i> <i>Bifidobacterium longum</i> / <i>B. dentium</i>
Estómago	10^1 - 10^3	<i>Candida albicans</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	--
Intestino delgado proximal	10^3 - 10^8	<i>Bacteroides</i> <i>Candida albicans</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> / <i>S. oralis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> / <i>S. hominis</i> <i>Lactobacillus</i>
Intestino delgado distal	10^5 - 10^7	<i>Bacteroides</i> <i>Candida albicans</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Veillonella</i>	--
Intestino grueso	10^{10} - 10^{11}	<i>Bacteroides</i> <i>Bacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Eubacterium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> / <i>B. animalis</i> / <i>B. bifidum</i> <i>Bacteroides distasonis</i>

4.4- Microbiota intestinal y la enfermedad celiaca

La microbiota intestinal tiene gran importancia médica, ya que las bacterias pueden influir de forma beneficiosa o dañina sobre la salud del hospedador. En condiciones no patológicas, el ecosistema intestinal está en equilibrio y los microorganismos no ejercen ningún efecto perjudicial sobre el hospedador. Sin

embargo, en determinadas situaciones, algunos microorganismos pueden dar lugar a infecciones 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 (238). La alteración de la microbiota del tracto gastrointestinal se ha asociado con frecuencia a muchas enteropatías como son las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, el cáncer de colon, así como desórdenes inmunes (239-241). Este desequilibrio en la microbiota intestinal se conoce como disbiosis intestinal y también ha sido descrita en pacientes con EC (72).

El hecho de que el gluten resulte inofensivo para la mayor parte de la población, incluyendo a aquellos individuos que presentan una susceptibilidad genética, demuestra que otros factores ambientales diferentes al gluten podrían tener un papel importante en el proceso patológico de la EC (33, 242). Un trabajo pionero llevado a cabo por Forsberg G *et al.* (84) demostró, la presencia de unas bacterias bacilares ancladas en el duodeno de niños con EC, que no estaban presentes en individuos sanos. Los autores concluyeron que la mucosa de los individuos susceptibles de padecer la EC podría promover la penetración bacteriana y la subsiguiente unión al epitelio. Este trabajo sugirió por primera vez el posible papel de las bacterias intestinales en la patogénesis de la EC (242). Desde entonces son numerosos los trabajos que han descrito un desequilibrio en la microbiota intestinal de los pacientes celíacos (72, 86-88).

- **Microbiota duodenal en sanos y celíacos**

La EC es una alteración que afecta a la parte superior del intestino delgado y con frecuencia se ha relacionado con la edad infantil. Por tanto, la mayoría de los trabajos publicados se han centrado en la caracterización de la microbiota duodenal de niños celíacos (activos y tratados) y sanos. Un estudio utilizando la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia mostró una reducción en la población de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como un incremento de *Bacteroides* y *Prevotella*, en biopsias duodenales de niños celíacos con respecto a niños sanos (88). Posteriormente, Collado MC *et al.* (85), mediante PCR a tiempo real, determinaron que dos poblaciones bacterianas asociadas al tracto gastrointestinal (*Bacteroides* sp. y *Clostridium leptum*) eran significativamente más abundantes en niños celíacos comparado con niños sanos, mientras que *Bifidobacterium longum* se veía disminuida en celíacos. En el mismo estudio se estableció que los niveles de *Escherichia coli* y *Staphylococcus* eran significativamente más altos en biopsias duodenales de niños

con EC activa frente a pacientes tratados o controles (85). En esta dirección, Sánchez E *et al.* (145), mediante electroforesis en gel desnaturalizante (DGGE), observaron una reducción en la diversidad de *Bacteroides* presente en las biopsias de niños celíacos, independientemente del tratamiento. De este modo, especies bacterianas como *Bacteriodes distasonis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides uniformis* y *Bacteroides ovatus* aparecían más frecuentemente en controles sanos que en pacientes celíacos activos y tratados, mientras que *Bacteroides vulgatus* aparecía incrementado sólo en sanos. En cambio, la diversidad de bifidobacterias era mayor en celíacos, presentándose las especies *B. adolescentis* y *B. animalis* más frecuentemente en pacientes celíacos activos que en sanos y celíacos en DSG (145). Todos estos trabajos muestran un disbiosis en la microbiota intestinal de niños celíacos (72).

En un estudio similar, llevado a cabo por Schippa S *et al.* (243) se analizó, mediante electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE), la composición de la microbiota asociada a la mucosa duodenal de niños con EC y de niños sanos. Los resultados mostraron una mayor diversidad en la mucosa duodenal de pacientes con EC y un perfil de bandas característico que podría estar asociado a la enteropatía. Además, los niños con EC presentaban perfiles electroforéticos diferentes antes y después del tratamiento con la dieta libre de gluten (243). Sin embargo, no sólo se observan diferencias en la composición de la microbiota duodenal entre niños sanos y celíacos; la actividad funcional de la microbiota también aparece alterada. Bernardo D *et al.* (142), mediante técnicas de zimografía, observaron que en pacientes celíacos aparecía un perfil de proteasas bacterianas capaces de hidrolizar gliadina que no se encontraba en individuos sanos. Este resultado sugiere que además de existir un desequilibrio en la microbiota intestinal de los niños celíacos, éstos también presentan una actividad proteolítica de origen bacteriana diferente.

No obstante, no todos los estudios presentan diferencias claras entre la microbiota de niños sanos y celíacos. Así, Ou G *et al.* (233), llevaron a cabo la caracterización de la microbiota de la parte proximal del intestino delgado de una población de niños suecos, mediante la secuenciación de una región del ADNr 16S, sin encontrar diferencias entre niños con EC y 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 se observó una gran proporción de bacterias del género *Clostridium*, *Prevotella* y *Actinomyces graevenizii* (233).

Los trabajos anteriormente mencionados realizaron un estudio descriptivo de la microbiota presente en el duodeno de niños sanos y celíacos. Sin embargo, como ya se ha dicho, la EC no es una enfermedad exclusiva de la edad infantil. Hoy en día, se sabe que la EC puede ser diagnosticada a cualquier edad, manifestándose más comúnmente durante la infancia o durante la tercera o cuarta década de la vida (34, 39). Pese a esto, pocos trabajos han descrito la microbiota duodenal de adultos celíacos y sanos. Nistal E *et al.* (89), mediante la construcción de una colección de clones del ADNr 16S, caracterizaron la microbiota duodenal de niños y adultos diagnosticados como no celíacos, celíacos activos y celíacos tratados. Los resultados de dicho trabajo mostraron diferencias en función de la edad (diferencias significativas entre niños celíacos y adultos celíacos) y de la dieta (diferencias significativas entre celíacos activos y tratados). Sin embargo, no se mostraron diferencias claras asociadas al diagnóstico de la enfermedad.

El sobrecrecimiento bacteriano duodenal también se ha asociado con la EC. Forsberg G *et al.* (84) encontraron unas bacterias bacilares en el duodeno de pacientes celíacos que podrían estar relacionadas con el proceso patológico de la EC. En esta dirección, Rubio-Tapia A *et al.* (244) confirmaron que las muestras duodenales de pacientes celíacos presentaban un sobrecrecimiento bacteriano que no aparecía en sanos. Además, este sobrecrecimiento se ha relacionado con aquellos pacientes celíacos en los que persisten los síntomas gastrointestinales tras la retirada del gluten de la dieta. Por tanto, el incremento de bacterias en el duodeno se ha investigado como una de las posibles causas por las que determinados pacientes celíacos no responden a la DSG (245).

- **Microbiota fecal en sanos y celíacos**

La inaccesibilidad del duodeno limita el número de muestras disponibles en los experimentos de caracterización de la microbiota intestinal. Además, la biopsia duodenal se lleva a cabo por un proceso incómodo para el paciente, por lo que con frecuencia los voluntarios que se engloban dentro del grupo control no son individuos totalmente asintomáticos (234). Por estas razones, y aunque la EC ocurra en la parte alta del intestino delgado, los estudios de caracterización de la microbiota fecal también son importantes. Es importante mencionar que aunque se encuentren poblaciones bacterianas diferentes en el colon y el duodeno, la microbiota fecal es capaz de reflejar al menos parte de la microbiota presente en el intestino delgado (85).

Un método indirecto para estudiar la microbiota intestinal en las heces consiste en la cuantificación de los productos metabólicos que producen las bacterias. Los AGCC son los principales aniones que surgen de la fermentación bacteriana de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, péptidos y glucopéptidos en el colon (218). La cuantificación de estos AGCC en muestras fecales de niños celíacos activos, niños celíacos tratados y niños sanos muestra un patrón diferente entre los tres grupos. Estos resultados sugieren una alteración en la actividad funcional de la microbiota intestinal entre sanos y celíacos. (165, 246-248). Un estudio posterior a éste, determinó que los familiares de primer grado de niños con EC también presentaban una actividad metabólica diferente en comparación a la de individuos sanos (249). Por tanto, esta alteración en la producción de metabolitos por la microbiota intestinal parece ser común en familiares y pacientes celíacos. Así mismo, los pacientes celíacos sintomáticos y no asintomáticos también muestran una concentración de AGCC similar en las muestras fecales (250).

Mediante la técnica de DGGE se han llevado a cabo varios trabajos que comparan los patrones de bandas generados por las muestras fecales de voluntarios sanos y pacientes celíacos. Sanz Y *et al.* (251), empleando cebadores universales, determinaron que la diversidad de la microbiota fecal de niños con EC era significativamente mayor que la de niños sanos. Además, utilizando cebadores para bacterias ácido-lácticas observaron un desequilibrio en los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Un estudio similar llevado a cabo por Di Cagno R *et al.* (246) también mostró que los niños celíacos activos presentaban un desequilibrio tanto en la comunidad de *Bifidobacterium* como en la de *Lactobacillus*. Así mismo, estudios realizados con adultos mostraron resultados similares. Nistal E *et al.* (248) observaron que los celíacos activos adultos presentaban una microbiota diferente que los voluntarios sanos, encontrando también un desequilibrio en el grupo de las bifidobacterias.

Otros estudios moleculares de las muestras fecales de sanos y celíacos reflejan variaciones similares a las encontradas en el duodeno. De acuerdo con esto, Collado MC *et al.* (85) analizaron las heces y biopsias de niños sanos y celíacos, mediante la técnica de PCR cuantitativa, mostrando que tanto en heces como en biopsia aparecía un incremento de *Bacteroides* sp. y *Clostridium leptum* en niños celíacos y un descenso de *Bifidobacterium longum*. También establecieron que los niveles de *Escherichia coli* y *Staphylococcus* fueron significativamente más altos en heces y biopsia de niños con EC activa con respecto a pacientes tratados y controles. Por otro lado, el análisis de la microbiota fecal también se llevó a cabo por la técnica

de hibridación *in situ* por fluorescencia. Mediante esta técnica se observó que las muestras fecales de niños celíacos activos y tratados presentaban una mayor proporción de bacterias Gram-negativas que los niños sanos, como ocurre en biopsias duodenales (252). Estos resultados demuestran que la microbiota fecal refleja parcialmente la microbiota presente en el duodeno (87), apoyando así la utilización de muestras fecales, mucho más fáciles de conseguir que las biopsias del intestino delgado, en el estudio de la microbiota intestinal de pacientes celíacos.

Además de los trabajos de caracterización de la microbiota intestinal descritos anteriormente, también se han realizado estudios de virulencia en bacterias potencialmente patógenas aisladas de pacientes celíacos. Sánchez E *et al.* (253) encontraron una asociación entre la EC y las enterobacterias patógenas. Las muestras fecales de niños con EC presentaban una menor diversidad dentro de la especie *E.coli* y las cepas aisladas de esta bacteria presentaban un mayor número de genes virulentos que las cepas obtenidas de niños sanos. Otras especies bacterianas que aparecen aumentadas en pacientes celíacos, como *Bacteroides fragilis* o *Staphylococcus spp*, también se han relacionado con genes y proteasas virulentas, que podrían estar relacionados con la EC (237, 254, 255). Como consecuencia, la actividad funcional de las bacterias presentes en el intestino de pacientes celíacos puede tener un papel importante en la aparición del proceso patológico de la EC.

OBJETIVOS

El trigo es uno de los cereales más consumidos en todo el mundo gracias a las propiedades reológicas que le confieren sus proteínas de reserva y que le permiten formar masa. Dichas características fisicoquímicas únicas se deben principalmente a las proteínas del gluten, las cuales son responsables además de su gran valor culinario, permitiendo la elaboración de pan y otros alimentos procesados. Por esta razón, la harina de trigo se encuentra presente en numerosos alimentos y su eliminación de la dieta es realmente complicada. A pesar de la importancia y ubicuidad de la harina de trigo en los alimentos, apenas existen estudios del metabolismo del gluten en humanos. Ésto es más sorprendente si tenemos en cuenta que el gluten es el principal causante de la EC, una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes en la actualidad, cuyo único tratamiento es llevar a cabo una dieta libre de gluten de por vida. Hoy en día se conoce que el gluten sólo es parcialmente digerido por las enzimas digestivas humanas generando péptidos inmunológicos de gran tamaño. Sin embargo, con frecuencia se subestima el papel de la microbiota en el proceso metabólico, la cual puede ejercer una función importante en la digestión de componentes recalcitrantes de la dieta, como las proteínas del gluten. El elevado consumo de gluten en la dieta y la resistencia de sus proteínas a las enzimas digestivas humanas nos permiten hipotetizar la existencia de bacterias en el tracto digestivo capaces de participar en el metabolismo del gluten. Contemplando todo lo expuesto anteriormente en el presente trabajo, y dado el creciente interés que despierta el estudio de la EC y su componente microbiano, los objetivos fundamentales propuestos para esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- Estudiar la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en individuos voluntarios sanos.
- Comparar la actividad metabólica de la microbiota intestinal entre voluntarios sanos y pacientes celíacos en dieta normal y dieta sin gluten.
- Analizar la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en familiares con un HLA-DQ susceptible a la EC (HLA-DQ2 y HLA-DQ8) y familiares de celíacos sin susceptibilidad genética.
- Realizar un estudio comparativo del metabolismo de la microbiota intestinal entre sanos, celíacos y los dos grupos de familiares.
- Caracterización de la microbiota fecal que participa en el metabolismo del gluten en sanos, pacientes celíacos y familiares de pacientes celíacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Sujetos de estudio

La selección de los individuos que participaron en el estudio se llevó a cabo por el Dr. Santiago Vivas, la Dra. Laura Arias y el Dr. Luis Vaquero del Departamento de Gastroenterología del Hospital de León. El período de recogida fue consecutivo entre Septiembre de 2008 y Octubre de 2012. Se recogieron muestras fecales provenientes de 5 tipos de individuos cuyos criterios de inclusión y exclusión se describen a continuación:

1- Voluntarios sanos: Individuos sin patología digestiva ni medicación crónica. Presentaron pruebas serológicas negativas para la EC (niveles normales de anti-transglutaminasa IgA y fenotipo HLA-DQ2/DQ8 negativos) y no tenían antecedentes familiares de la enfermedad. A su vez, presentaron niveles normales de hemoglobina y otros marcadores sanguíneos incluyendo parámetros renales y hepáticos.

2- Enfermos celíacos activos: cumplían criterios diagnósticos de enfermedad celíaca con serología positiva y diferentes grados de atrofia vellositaria en la biopsia de la mucosa duodenal. A su vez, todos presentaban genética positiva (HLA-DQ 2/DQ8). Las muestras en estos pacientes fueron recogidas en el momento del diagnóstico antes de comenzar la dieta sin gluten. Se excluyeron aquellos casos dudosos donde faltaba alguno de los parámetros reflejados.

3- Enfermos celíacos tratados: Sujetos previamente diagnosticados con enfermedad celíaca y que llevaban más de 1 año realizando dieta sin gluten. En todos ellos se realizó una biopsia duodenal de control que reflejaba una recuperación de la atrofia vellositaria, que presentaban al diagnóstico, junto con una serología de enfermedad celíaca negativa.

4- Familiares de pacientes celíacos: Este grupo estaba formado por familiares de primer grado (padres y/o hermanos) de pacientes con EC (fundamentalmente niños celíacos). Todos ellos tenían serología negativa para la enfermedad y biopsia duodenal sin atrofia vellositaria, para diferenciarlos del grupo de enfermos celíacos. Estos familiares se dividieron en dos grupos según la presencia o no del HLA-DQ de riesgo para celíaca, de modo que aquellos familiares que presentaban un HLA-DQ2/DQ8 en las pruebas genéticas se englobaron en un grupo (HLA positivo) y los que no lo presentaban en otro (HLA negativo).

El acceso al estudio fue totalmente voluntario obteniéndose el consentimiento informado de todos los adultos participantes y de los padres en caso de que los individuos incluidos en el estudio fueran menores de edad. Se excluyeron aquellos voluntarios que habían tomado antiinflamatorios no esteroideos durante las cuatro semanas anteriores o corticoesteroides en los tres meses previos al experimento, así como aquellos individuos con otros tipos de patologías intestinales, alergias alimentarias o cuadros infecciosos que hubiesen requerido la toma de antibióticos en las cuatro semanas previas. Todos los protocolos y experimentos de estudio fueron aprobados por la Comisión de Ética del Hospital de León.

Los pacientes que llevaron a cabo una dieta sin gluten fueron informados sobre los tipos de alimentos que podían y no podían consumir durante este período. La dieta fue controlada en todo momento y los individuos anotaron las comidas que consumieron durante el ensayo en un dietario. Para detectar un posible consumo inadvertido de gluten durante el período de DSG se hizo un cuestionario final por la sección de Aparato digestivo del Hospital de León.

2- Recogida y conservación de muestras

Todos los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se realizaron con muestras fecales humanas. Estas muestras fueron homogenizadas con depresores estériles en un tiempo no superior a 3 horas tras la defecación. El procesamiento posterior fue muy dependiente del ensayo que se realizó:

- Las muestras destinadas a la cuantificación de los AGCC, así como a la detección de gluten fecal, se alicuotaron y se guardaron en un arcón de -80 °C hasta el momento del análisis.

- Las muestras destinadas al análisis de actividades enzimáticas (ATF, AGF, actividad PEPF, actividad DPPIVF y actividad peptidásica frente al 33-mer) se diluyeron en una proporción 1:5 (p/v) con una solución salina de NaCl al 0,9% y se dejaron 90 minutos a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron a 8.000 rpm a una temperatura de 4 °C durante media hora y se recogieron los sobrenadantes que fueron conservados a -20 °C hasta el momento de su análisis, salvo en el caso de la AGF que fue analizada en el momento.

- Las muestras fecales destinadas al cultivo de heces en los medios MCG fueron proporcionadas de manera diferente por el individuo. En el momento de la defecación, los voluntarios introdujeron la muestra de heces dentro de un envase de cierre hermético, junto con un sobre de anaerobiosis (Oxoid) que contenía ácido ascórbico, y las muestras se llevaron al Departamento de Gastroenterología del Hospital de León antes de 3 horas. Para llevar a cabo una mayor disgregación de las muestras, estas heces se homogenizaron con un Stomacher (Seward stomacher 80) en lugar de utilizar depresores. Las muestras fecales se diluyeron en una proporción 1:5 (p/v) de NaCl al 0,9% + 0,5 g/L de cisteína, para evitar el contacto con oxígeno disuelto durante el procesamiento, y se sembraron en el menor tiempo posible en los medios MCG.

3- Cuantificación de actividades proteolíticas fecales

3.1- Actividad tríptica fecal (ATF)

La ATF son los restos de actividad de la tripsina, una enzima pancreática que se secreta en el duodeno, que llegan a las heces. El ensayo para determinar la ATF se realizó siguiendo el protocolo descrito por Ramare F *et al.* (256) con modificaciones:

- Se añadieron 100 µL de los sobrenadantes de las heces congeladas a -20 °C con 2,9 mL de Tris buffer 10 mM (pH 8,2) conteniendo NaCl a una concentración 20 mM. Para iniciar la reacción, se añadieron 0,6 mL del sustrato sintético 3 mM BAPNA (N-benzoil-L-arginina-4-nitroanilida) (Sigma-Aldrich) que es un sustrato cromogénico reconocido por la tripsina. La reacción se llevó a cabo durante 20 minutos en un baño a 20 °C.

- La reacción se detuvo añadiendo 0,6 mL de ácido acético 5 M.

- Las muestras se analizaron mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm. El valor real de absorbancia se calculó restando al valor obtenido tras la incubación el de la muestra parada a tiempo cero.

- Los valores de ATF se expresaron en microgramos de actividad tríptica (unidades) por gramo de heces. Para ello se realizó una curva estándar en cada prueba de ATF, empleando tripsina tipo III de páncreas bovino (Sigma-Aldrich) disuelta

en 2 mM de ácido hidroclicóric. La tripsina tipo III está tratada con TPCK (L-1-tosylamida-2-feniletildlorometilcetona) que inactiva la actividad quimotripsina.

3.2- Actividad glutenásica fecal (AGF)

La AGF es una actividad proteolítica degradadora de gluten que se detecta en las heces mediante bioensayo. El método para determinar la AGF se puso a punto en nuestro laboratorio, y se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Los sobrenadantes de las heces frescas se filtraron a través de filtros de 0,22 μm para eliminar la carga de microorganismos.
- La actividad glutenásica se determinó por bioensayo en un medio sólido con una base de gluten al 3%. El gluten (Sigma-Aldrich) se disolvió en buffer fosfato al 1% junto con agar al 1,6%. El medio se esterilizó durante 10 minutos a 121 $^{\circ}\text{C}$ y se vertió en placas de petri de tamaño pequeño (5,5 cm de diámetro) un volumen de 12 mL de medio.
- Se cargaron 100 μL de los sobrenadantes fecales en la placa con gluten y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ en una estufa durante 24 horas.
- Tras la incubación se midieron los diámetros de los halos de degradación transparentes generados en la placa con gluten.
- La actividad glutenásica se expresó en microgramos de tripsina (unidades) por gramo de heces. Para ello se realizó una curva estándar de tripsina disuelta en solución salina.

3.3- Actividad prolilendopeptidásica fecal (PEPF)

Las PEPs son endoproteasas pertenecientes a la familia de las prolil oligopeptidasas que tienen la capacidad de degradar péptidos con residuos internos de prolina (257-259). El ensayo para determinar la actividad PEP en heces se realizó siguiendo el método fluorimétrico descrito por Goossens F *et al.* (260) con modificaciones.

- Se añadieron 10 μL de los sobrenadantes de las heces congeladas a -20 $^{\circ}\text{C}$ en 100 μL de buffer fosfato 100 mM (pH=7,5) con EDTA 1 mM y ditiotreitól (DTT) 1 mM

preincubado a 37 °C. Para iniciar la reacción se añadieron 5 µL del sustrato fluorogénico N-benciloxicarbonil-glicil-prolil-7-amido-4-metil-cumarina (Z-Gly-Pro-AMC) (Bachem), disuelto a una concentración final de 0,12 mM en DMSO. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos oscuras con la base transparente.

- Las placas se incubaron durante 120 minutos a 37 °C totalmente protegida de la luz y se detuvieron las reacciones añadiendo 50 µL de ácido acético 1 M.

- Las muestras se analizaron mediante espectrofluorescencia a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 440 nm. El valor real de fluorescencia se calculó restando al valor obtenido tras la incubación, el de la muestra parada a tiempo cero.

- Los valores de PEP se expresaron en unidades internacionales/g de heces. La unidad de actividad PEP se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de 7-amino 4 -metilcoumarina por minuto. Para ello se realizó previamente una curva estándar.

3.4- Actividad dipeptidil peptidásica IV (DPPIV)

La DPPIV es una exoproteasa perteneciente a la familia de las prolil oligopeptidasas que tienen la capacidad de degradar péptidos con residuos de prolina (258). La actividad DPPIV se caracteriza por hidrolizar los dos últimos restos aminoacídicos del extremo N-terminal cuando aparece un residuo de prolina en la posición dos (258, 259). El ensayo para determinar la actividad DPPIV en heces se realizó utilizando el sustrato colorimétrico glicil-prolil-p-nitroanilida tosilada descrito por Nagatsu T *et al.* (261) y el protocolo descrito por Elgün S *et al.* (262) con modificaciones:

- Se añadieron 10 µL de los sobrenadante de las heces congeladas a -20 °C en 100 µl de buffer glicina-NaOH 71 mM (pH=8.5) preincubado a 37 °C. Para iniciar la reacción, se añadieron 5 µl del sustrato cromogénico glicil-prolil p-nitroanilida tosilada (H-Gly-Pro-pNa tosilada) (Bachem) disuelto en tritón a una concentración final 3 mM. Las reacciones se a cabo llevaron en placas de 96 pocillos transparentes.

- Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y las reacciones se detuvieron añadiendo 50 µL de ácido acético 1 M.

- Las muestras se analizaron mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 385 nm. El valor real de absorbancia se calculó restando al valor obtenido tras la incubación el de la muestra parada a tiempo cero.

- Los valores de DPPIV se expresaron en unidades internacionales/g de heces. La unidad de actividad DPPIV se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de p-nitroanilina por minuto. Para ello se realizó previamente una curva estándar utilizando 4-nitroanilina.

4- Cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Los AGCC son los principales aniones que surgen de la fermentación bacteriana de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, péptidos y glucopéptidos en el colon (216-218). La cuantificación de los AGCC permite estudiar de una manera indirecta la actividad funcional de la microbiota intestinal. El análisis de los AGCC se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Miguel Ángel Ferrero y el Dr. Leandro Rodríguez, del Área de Bioquímica de la Universidad de León, y se realizó en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León.

4.1- Extracción de los AGCC

Para llevar a cabo la extracción de AGCC se utilizó el protocolo descrito por Whelan K *et al.* (263):

- Las alícuotas guardadas a -70 °C se resuspendieron en agua MilliQ en una proporción 1:5 (p/v) y se homogeneizaron en un vórtex hasta que las heces estaban totalmente resuspendidas.

- Se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, y se recogieron los sobrenadantes.

- Para disminuir el pH de los sobrenadantes de las heces se añadió ácido clorhídrico a una concentración final de 80 mM.

- Se añadió el estándar interno 4-metilvalérico a una concentración final de 258 μM y se llevó a cabo la inyección de las muestras en el cromatógrafo de gases.

4.2- Condiciones cromatográficas

La determinación de los AGCC fecales se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Zhao G *et al.* (264) con modificaciones. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases *Perkin Elmer Autosystem XL GC* equipado con un detector de llama por ionización (FID) y una columna capilar de 30 m x 0,53 mm de diámetro revestido con 1 micra de espesor de película. Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las siguientes:

- Columna: *TRB-FFAP* (30 m x 0,53 mm x 1 μm), Teknokroma SL. El relleno es polietilenglicol esterificado con ácido nitro tereftálico de fase entrecruzada y ligada. Part number: TR-151035

- Gas portador: Helio (12 mL/min) con una tasa de presión de 13,8 psi.

- Programa de temperaturas: horno a 130 °C de temperatura inicial, durante 3 minutos, para luego subir hasta 170 °C a una velocidad de 40 °C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 2 minutos. El tiempo de carrera es de 6 minutos.

- Inyección: Temperatura 250 °C. Modo Split (120 mL/min). El volumen de inyección fue 0,5 μL y la técnica de inyección fue automática.

- Detector: detector por llama de ionización (FID) y puerto de inyección a una temperatura de 250 °C.

- Los estándares de ácidos grasos volátiles se obtuvieron de Sigma-Aldrich y Fluka. Para cuantificar el área del pico se utilizó la metodología descrita por Ranilla MJ *et al.* (265).

5- **Estabilidad del péptido 33-mer en muestras fecales**

El péptido 33-mer de la α -gliadina es uno de los péptidos más resistentes e inmunotóxicos del gluten. Se analizó la actividad peptidásica de las muestras fecales frente a este péptido. Para ello se incubaron los sobrenadantes de las heces con el

péptido 33-mer a distintos tiempos. La estabilidad del péptido se comprobó mediante HPLC.

5.1- Incubación del péptido 33-mer con muestras fecales

Los sobrenadantes de las muestras fecales que habían sido conservadas a -20 °C se incubaron con el péptido 33-mer a distintos tiempos:

- Se mezclaron 7 µL del péptido 33-mer, a una concentración final de 60 µM, con 5µL de los sobrenadantes de las muestras fecales, en un volumen final de reacción de 60 µL, que se obtuvo añadiendo PBS. La incubación se llevo a 37 °C durante distintos tiempos (2h, 6h, 8h y 12h).

- A su vez, también se incubaron los siguientes controles:

- Blanco 1: 60 µL de PBS
- Blanco 2: 5 µL de sobrenadante fecal + 55 µL de PBS
- Control negativo: 7 µL péptido 33-mer (60 µM) + 53 µL de PBS
- Control positivo: 7µL péptido 33-mer (60 µM) + 5 µL enzima degradadora 33-mer + 48 µL PBS

- Una vez llevadas a cabo las incubaciones, se pararon las reacciones calentando las mezclas a 100 °C durante 10 minutos.

- Las mezclas se pasaron por amicones con un tamaño de poro de 0,22 µm centrifugándolos durante 2 minutos a 8.000 rpm. Los eluidos se pasaron a viales de HPLC y se mantuvieron a 4 °C.

5.2- Condiciones cromatográficas

Para comprobar la estabilidad del 33-mer tras la incubación de los sobrenadantes fecales, las muestras se inyectaron en un HPLC *Waters Alliance* utilizando una columna de fase reversa con un relleno esférico de 5 µm de partícula. Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las siguientes:

- Columna: *Lichrospher 100 RP18* de 25 cm de longitud y 0,4 cm de diámetro (Teknokroma SL). Es una columna en fase reversa con un relleno esférico de 5 µm de partícula de carácter hidrofóbico (lichrospher). Part number: TR-015243
- Fases móviles: Se utilizó una fase móvil A con agua MilliQ + trifluoroacético al 0,1% y una fase móvil B con acetonitrilo + trifluoroacético al 0,1%.
- Programa: El flujo se mantuvo durante todo el programa a 1 mL/min. La temperatura de la columna fue de 35 °C y se estableció por un horno de temperatura del HPLC. Se siguió el siguiente programa para cada inyección:
 - 100% de solución A durante 2 minutos.
 - Paso progresivo de solución A a solución B durante 20 minutos.
 - 100% de solución B durante 5 minutos.
 - Paso progresivo de solución B a solución A durante 5 minutos.
 - 100% solución A durante 3 minutos.
- Inyección: El volumen de inyección fue 10 µL y la técnica de inyección fue automática.
- Detector: Se utilizó un detector de PDA (Array de fotodiodos) 2998. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 215 nm.
- Programa de análisis: Para el análisis de los resultados se utilizó el software *Empower 2 Pro* (Waters 2005).

6- Cultivo de muestras fecales en medios con gluten

Las muestras fecales se cultivaron en medios con gluten (MCG) con la finalidad de obtener cepas bacterianas provenientes del intestino con capacidad de participar en el metabolismo del gluten. Para ello, las muestras fecales se incubaron en medios MCG líquidos, que permitían la proliferación de bacterias proteolíticas, y luego se sembraron en medios MCG sólidos. También se sembraron directamente las muestras fecales sin la incubación en medio líquido. Se seleccionaron aquellas cepas con actividad glutenásica y/o aquellas que eran incapaces de crecer en el mismo medio en el que se aislaron cuando se retiraba el gluten.

6.1- Cultivo de heces en medio líquido

Las muestras fecales se incubaron en 3 medios de cultivo líquido, con gluten como principal fuente de nitrógeno, durante 48 h en condiciones anóxicas estrictas. El objetivo fue la proliferación de bacterias proteolíticas del gluten para ser posteriormente caracterizadas mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) o por técnicas de cultivo. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Las heces destinadas al cultivo en medio líquido se introdujeron dentro de un envase de cierre hermético junto con un sobre de anaerobiosis (Oxoid) que contenía ácido ascórbico. Las muestras se mantuvieron en este envase hasta ser procesadas.
- Las muestras fecales se diluyeron en una proporción 1:5 (p/v) de NaCl al 0,9% + 0,5 g/L de cisteína y la disgregación se llevó a cabo con un stomacher.
- En matraces de 50 mL se añadieron un volumen de 30 mL de MCG líquido a los que se inocularon 300 µL de las muestras fecales a analizar resuspendida en NaCl al 0,9%+0,5 g/L de cisteína.
- Los matraces se introdujeron dentro de una jarra de anaerobiosis junto con un sobre de anaerobiosis con ácido ascórbico (Oxoid). Para comprobar que las condiciones anóxicas eran correctas se añadió también a la jarra un indicador de resazurina (Oxoid). La jarra se incubó a 37 °C durante 48 h en condiciones de agitación suaves (50 rpm).

6.2- Cultivo de heces en medio sólido

Se realizó un cultivo en medio sólido de las muestras fecales directamente, así como del medio con gluten líquido tras la incubación con las muestras fecales. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- Se realizaron diluciones seriadas de las muestras fecales, y del cultivo de las heces en MCG, utilizando NaCl al 0,9% + 0,5 g/L de cisteína, hasta la dilución 10^{-8} .
- Se añadieron 100 µL de las muestras anteriores en placas de petri con MCG sólido y las placas se introdujeron dentro de una jarra de anaerobiosis, junto con un

sobre de anaerobiosis con ácido ascórbico y un indicador de resazurina (Oxoid). La jarra se incubó a 37 °C durante 48 h.

- Después de la incubación se llevó a cabo un análisis en *visu* de las distintas morfologías de las colonias crecidas en los tres medios. Solamente se seleccionaron aquellas colonias con actividad glutenásica (es decir, las que mostraban un halo degradativo alrededor de la colonia) y aquellas que eran incapaces de crecer en los mismos medios en los que fueron aislados, pero sin el gluten.

6.3- Medios de cultivo con gluten (MCG)

Se utilizaron tres MCG diferentes para realizar el cultivo de las muestras fecales. La composición de los tres medios esta descrito en la Tabla 4.

Tabla 4: Descripción de los tres medios con gluten (MCG) utilizados en el cultivo de muestras fecales.

Componentes	MCG-1	MCG-2	MCG-3
Buffer	Buffer fosfato 1% (p/v) pH=6,5	Buffer fosfato 1% (p/v) pH=6,5	NaHCO ₃ 0,4 g/L pH=7
Fuente de Carbono	Glucosa 20 g/L	Glucosa 20 g/L	Glucosa 1 g/L Piruvato sódico 1g/L Succinato sódico 0,5g/L
Fuente de Nitrógeno	Gluten 30 g/L	Gluten 25 g/L Digerido gluten 0,5% (v/v)*	Gluten 25 g/L Digerido gluten 0,5% (v/v)*
Sales	CaCl ₂ 0,05 g/L ZnSO ₄ 0,07 g/L	CaCl ₂ 0,05 g/L ZnSO ₄ 0,07 g/L NaCl 5 g/L CaOH ₂ 0,15 g/L	CaCl ₂ 0,05 g/L ZnSO ₄ 0,07 g/L NaCl 5 g/L CaOH ₂ 0,15 g/L
Aminoácidos	L-Cys 0,5 g/L	L-Cys 0,5 g/L	L-Cys 0,5 g/L L-Arg 1 g/L
Vitaminas			Vitamina K1 0,0001% (v/v) Tiamina 0,001 g/L Riboflavina 0,001 g/L Biotina 0,001 g/L
Otros	Tween 80 0,1% (v/v)	Extracto carne 2g/L Peptona carne 5g/L	Extracto carne 1 g/L Peptona de carne 1 g/L Pirofosfato soluble 0,25 g/L Hemina 0,01 g/L
Medios sólidos	Agar 1,6% (p/v)	Agar 1,6% (p/v)	Agar 1,6% (p/v)

*El digerido de gluten se obtuvo tras la incubación de 0,5 g de gluten con 1,7 g de pepsina en 500 mL de agua durante 2 horas a 37 °C a pH ácido (pH=2) y agitación 180-200 rpm.

Los medios utilizados contenían gluten como fuente principal de nitrógeno. Para obtener los medios sin gluten, se añadieron los mismos componentes descritos en la Tabla 4 eliminando el gluten y el digerido de gluten. Los medios se podían preparar como medio sólido, añadiendo agar al 1,6% (p/v) o líquido (quitando el agar). Los MCG 1 y 2 fueron puestos a punto en nuestro laboratorio. En cambio, el MCG-3 ha sido obtenido por la modificación del medio utilizado por Zamakhchari M *et al.* (136) para la búsqueda de microorganismos degradadores de gluten en la cavidad bucal.

7- Caracterización y mantenimiento de las cepas que participan en el metabolismo del gluten

Las colonias seleccionadas en el cultivo de muestras fecales se caracterizaron para saber que especies bacterianas tenían la capacidad de metabolizar el gluten. Para ello, de cada cepa se hicieron varios pases hasta obtener colonias aisladas. De estas bacterias se hizo un cultivo puro en medio líquido con el objetivo de amplificar el número de células y extraer el ADN. Tras la extracción, se cuantificó el ADN y se amplificó un fragmento codificante de ARN ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Este fragmento se clonó en el vector *StrataClone* amp/kam y se transformó en *E.coli* con el kit comercial *StrataClone Cloning* (Stratagene). Se comprobó que las bacterias clonadas poseían el fragmento a secuenciar mediante minipreparaciones, con las que se extraía el ADN plasmídico, y enzimas de restricción que permitían cortar el fragmento clonado. Se purificó el ADN plasmídico de las bacterias que habían incorporado el fragmento de interés y se mandó a secuenciar al Área de Secuenciación de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León. La identificación molecular de las cepas se llevo a cabo mediante diversos programas informáticos de procesamiento y alineamiento, para después ser comparados en la base de datos GenBank del NCBI.

7.1- Mantenimiento de las cepas bacterianas aisladas

Las cepas aisladas se conservaron a una temperatura de 4 °C, en placas petri selladas con Parafilm®, durante un mes como máximo. Para períodos de conservación más largos, las bacterias se almacenaron congeladas a una temperatura de -80 °C. Con este objetivo, las cepas puras se cultivaron en medio MCG líquido en condiciones anóxicas estrictas, hasta alcanzar la fase estacionaria. El cultivo se centrifugó y el pellet obtenido se resuspendió en 500 µL de glicerol al 40% que ejercía como protector de la membrana bacteriana. Las cepas diluidas en glicerol se guardaron en el arcón de -80 °C.

7.2- Extracción de ADN genómico de cultivos bacterianos

Para llevar a cabo la extracción de ADN genómico de cultivos bacterianos se empleó el kit *SpeedTools Tissue DNA Extraction* (Biotools). El procedimiento llevado a cabo fue el descrito en el protocolo del kit comercial:

- En el procedimiento habitual, se recogía una colonia del cultivo puro a identificar y se crecía en TSB*. Sin embargo, muchas bacterias no crecían en TSB, así que en estos casos se utilizaba el MCG líquido en el que se aislaba la cepa. Algunas bacterias no eran capaces de crecer tampoco en MCG líquido así que se recogieron las colonias directamente de la placa de petri, con el cultivo puro de la cepa, añadiendo 200 µL de agua MilliQ estéril.

- Se recuperaron las células mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 5 minutos a partir de 1 mL de cultivo bacteriano.

- Los pellets se resuspendieron en 180 µL de tampón BT1 pipeteando arriba y abajo. A continuación se añadieron 25 µL de proteinasa K. Las muestras se mezclaron con el vórtex de forma vigorosa y se incubaron a 56 °C hasta que se obtuvo una lisis completa (1-3 h). Se mezclaron con el vórtex ocasionalmente durante el período de incubación. El objetivo de este paso era el lisado de las células. (Algunas cepas como las Gram-positivas son más difíciles de lisar. En estos casos se preincubaron las muestras con enzimas líticas. Se resuspendieron el pellet en lugar de en tampón BT en tampón: 20mM Tris/HCl; 2 mM EDTA; 1% Tritón X-100; pH 8 suplementado con 20 mg/mL de lisozima. Se incubaron a 37 °C durante 30-60 minutos).

- Se mezclaron las muestras con el vórtex y se añadieron 200 μ L de tampón BB3 de lisis. Se mezclaron de nuevo con el vórtex de forma vigorosa (10-20 segundos) y se incubaron a 70 °C durante 10 minutos. Se mezclaron con el vórtex brevemente.
- Se añadieron 210 μ L de etanol (96-100%) al lisado y se mezclaron bien usando el vórtex.
- Se cargaron los lisados en columnas, se centrifugaron 1 minuto a 11.000 rpm y se desecharon los tubos con los filtrados. El ADN queda unido a la columna.
- Se llevaron a cabo dos lavados de la membrana de sílica del filtro. En el primer lavado se añadieron 500 μ L de tampón BBW, se centrifugó 1 minuto a 11.000 rpm y se desecharon los tubos con el filtrado. En el segundo lavado se añadieron 600 μ L de tampón BB5 y se centrifugaron de nuevo 1 minuto a 11.000 rpm. Se desecharon los tubos con el filtrado.
- Se eliminó el etanol residual, para ello se colocaron las columnas en microtubos de 1,5 mL y se centrifugaron durante 1 minuto a 11.000 rpm.
- Para la elución del ADN puro se añadieron 100 μ L de tampón BBE, precalentado a 70 °C, directamente en las membranas. Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto y seguidamente se centrifugaron 1 minuto a 11.000 rpm. El eluido contiene el ADN puro de la muestra.
- Una vez extraído el ADN se cuantificaron las concentraciones de los ácidos nucleicos midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1.000, Biocompare). Este sistema permitió medir la concentración de ADN expresada en ng/ μ L a partir de un volumen de muestra de 1,5 μ L. Al mismo tiempo midió los ratios de absorbancia entre 230/260 nm y 260/280 nm que permiten evaluar la pureza del ADN cuantificado.

***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 generales. Composición: Peptona de caseína 20 g/L, Peptona de soja 5 g/L, Glucosa 2,5 g/L, NaCl 6 g/L, K₂HPO₄ 2,5 g/L. Se ajustó el pH a 7,5. Para uso como medio sólido se añade agar al 2%. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos (266).

7.3- Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La PCR es un método sencillo, descrito inicialmente por Mullis KB & Faloona FA (267), que permite la amplificación *in vitro* de fragmentos de ADN, mediante una serie de incubaciones a distintas temperaturas. Mediante esta técnica se amplificaron, a partir del ADN molde extraído de las bacterias puras, los fragmentos de ADN codificante para el ARNr 16S. Para ellos se utilizaron los cebadores universales 27F y E939R (Isogen Life Science) (Tabla 5), la *rTaq* polimerasa (GE Healthcare) y un termociclador de Biometra, modelo *TProfessional Gradient*. La región codificante del ARNr 16S, de aproximadamente unas 900 pares de bases, se utiliza con frecuencia en la identificación molecular, ya que permite identificar casi todas las cepas a nivel de especie, debido a que esta región presenta zonas hipervariables intercaladas entre regiones ampliamente conservadas.

Tabla 5: Descripción de los oligonucleótidos empleados para el ensayo de PCR.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
27F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG		
E939R	CTTGTCGGGCCCGTCAATTC	912	42

- Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L. Los componentes y las concentraciones de los mismos empleadas en las reacciones de PCR se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Componentes y concentraciones para la reacción de PCR en un volumen final de 25 μ l empleando la enzima *rTaq* polimerasa.

Componentes	Volumen	Concentración final
10x PCR tampón	2,5 μ L	1x
10 mM dNTP mezcla	0,5 μ L	0,2 mM de cada dNTP
10 μ M cebador directo	2,5 μ L	1,0 μ M
10 μ M cebador reverso	2,5 μ L	1,0 μ M
DNA molde	20-50 ng	20-50ng
<i>rTaq</i> polimerasa (5 unidades/ μ l)	0,2 μ L	0,04 unidades/ μ l
Agua MilliQ	Hasta 25 μ L	NA

- Las PCR se iniciaron 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 42 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto. Tras los 30 ciclos de amplificación se mantuvieron las muestras a 72 °C durante 7 minutos para finalizar la extensión de las cadenas.

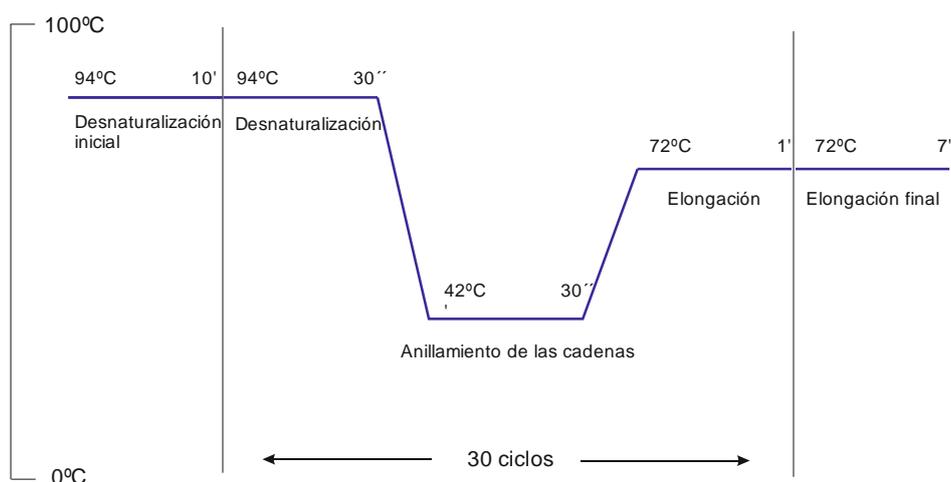


Figura 7: Ciclos que se llevaron a cabo en el termociclador para realizar la PCR de una región de ADN de 900 pb codificante de ARNr 16S.

- Para comprobar si se habían llevado a cabo las amplificaciones del fragmento, se utilizó la electroforesis en geles de agarosa. Las condiciones de electroforesis para separar moléculas de ADN en geles de agarosa se basaron en las descritas previamente por Maniatis T *et al.* (266). Para la preparación del gel, se utilizó agarosa D1-electroendosmosis media (Pronadisa). El porcentaje de agarosa era muy dependiente del tamaño de fragmento de ADN que se quería utilizar. Los fragmentos de ADN amplificados eran de unas 900 pb por lo que se utilizaron geles de agarosa al 1,6% disueltos en Tris acetato EDTA (TAE) al 1%. Las muestras de ADN que se cargaron en el gel se prepararon añadiendo tampón de carga 6X que permitía dar densidad a la muestra y ver como corría durante la electroforesis. Una vez cargadas en el gel, se llevó a cabo la electroforesis en tampón TAE 1X aplicando un voltaje aproximado de 5 V por cm² de la cubeta. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó 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:

NIHindIII: 23.130; 9.416; 6.557; 4.361; 2.322; 2.027; 564; 125 pb.

***NI*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.

- Para llevar a cabo este apartado se necesitaron estas soluciones:

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 L.

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.

7.4- Ligación del fragmento en un vector

Una vez amplificado el ADN de las bacterias que se pretendían identificar, se llevo a cabo una ligación de los fragmentos en un vector comercial. Para ello se empleó el kit comercial *StrataClone PCR Cloning* (Stratagene).

- Las ligaciones se prepararon siguiendo las indicaciones del kit comercial. Se mezclaron en orden las siguientes cantidades: 3 µL del tampón *StrataClone Cloning*, 2 µL del producto de PCR (5-50 ng), 1 µL del vector *StrataClone amp/kan*. Las mezclas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se colocaron en hielo. En este paso los fragmentos de ADN quedan insertos en el vector comercial.

- El vector proporcionado por Stratagene es el plásmido *pSC-A-amp/kan* que presenta un tamaño de 4,3 kb. Sus características principales son las siguientes:

- o Contienen un fragmento del gen *LacZ* (subunidad α de la β -galactosidasa) capaz de complementar la mutación presente en la β -galactosidasa que tienen las cepas de *E. coli* portadoras de la delección *Lac Δ M15* (proceso denominado α -complementación). Esta complementación permite 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.

- 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 que presentan en uno de sus extremos la Topoisomerasa I, covalentemente unida al vector, junto con una uridina terminal modificada (U*). En el otro extremo aparece 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 es (vector^{ori}-producto de PCR-vector^{amp/kan}) (Figura 10).

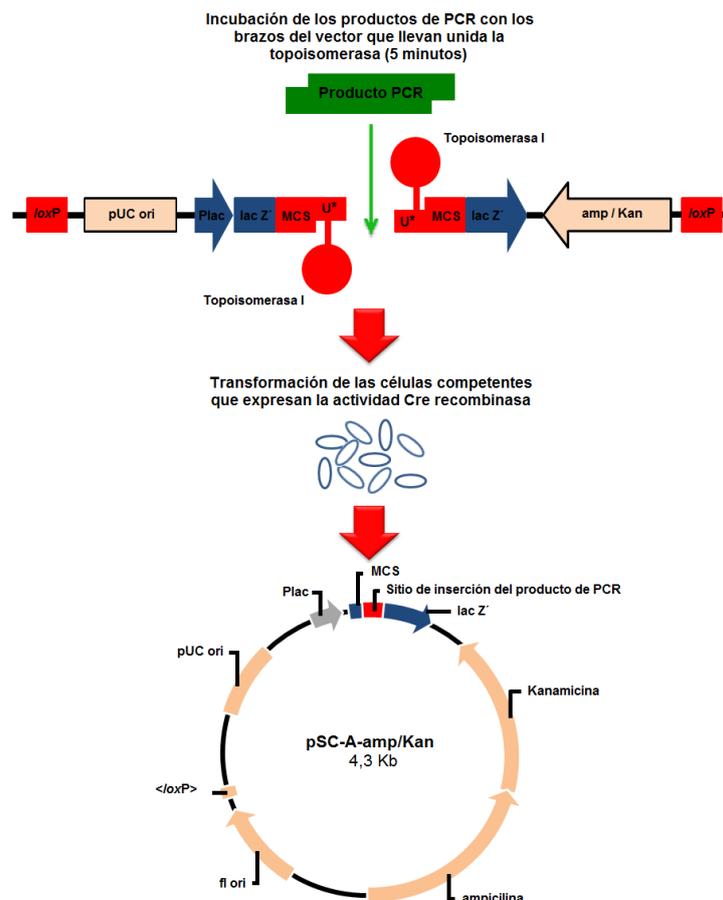


Figura 8: Mecanismo de acción del *StrataClone PCR cloning* (Stratagene).

7.5- Transformación del vector en *E.coli*

Los productos de la reacción de ligación se transformaron en células comerciales químicamente competentes de *E.coli* (*StrataClone*TM *SoloPack*[®] *Competent cells*). Estas cepas fueron 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 permitió la selección por color de aquellos transformantes portadores de un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación. Además, poseían la capacidad de expresar la enzima *Cre* recombinasa la cual es capaz de reconocer los sitios *loxP* del plásmido lineal y llevar a cabo la recombinación entre ambos, dando lugar a una molécula de ADN circular (pSC-A-amp/kan, Figura 10). Estas cepas bacterianas también eran resistentes a la estreptomycin. El proceso de transformación se llevo a cabo siguiendo las indicaciones del kit comercial *StrataClone* (Stratagene).

- Se descongelaron las células competentes lentamente en hielo durante unos 5 minutos. Una vez descongeladas, se mezcló el contenido de los viales con 1 μ L de las reacciones de ligación. Las mezclas se incubaron en hielo durante 20 minutos y durante este período de incubación, se precalentó el medio LB a 42 °C.
- Se dio un choque térmico a las células en un baño a 42 °C durante 45 segundos. A continuación se enfriaron rápidamente las mezclas en hielo durante 2 minutos.
- Se añadieron 250 μ L de medio LB precalentado a las mezclas de reacción de transformación y se incubaron a 37 °C con agitación (250 rpm) durante 60 minutos.
- Se sembró 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.
- Se incubaron las placas a 37 °C durante toda la noche.
- Para llevar a cabo este protocolo se necesitaron los siguientes productos

Medio LB (Luria-Bertani). Se empleó como medio general para el crecimiento de *E. coli*. Composición: Bactotripton 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L. Se ajustó el pH a un valor de 7,5 con NaOH 10M. Para su uso como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C (266).

Kanamicina (kan): Antibiótico, 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. En los experimentos de transformación de *E.coli* se utilizó a una concentración de 40 µg/mL (266).

7.6- Extracción ADN plasmídico de *E. coli*: Minipreparaciones

La extracción de ADN plasmídico mediante minipreparaciones, junto con la digestión de ADN con enzimas de restricción, se llevo a cabo para comprobar si la clonación se había llevado con éxito. Para ello se siguió un método basado en el protocolo descrito por Holmes DS & Quigley M (268).

- Se inoculó una colonia de *E.coli*, procedente de cada proceso de clonación, en 1 mL de medio TB, suplementado con el antibiótico Kanamicina. Después los inóculos se incubaron a 37 °C con agitación (250 rpm) durante al menos, 6 horas.

- Se recogieron las células por centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos. Los precipitados se resuspendieron en 350 µL de STET y se añadieron en la tapa del tubo eppendorf 10 µL de solución de lisozima (a una concentración de 10 mg/mL disuelta en agua) con el objetivo de lisar las células.

- Se mezclaron con el vórtex durante un minuto para que se resuspendieran bien los precipitado y seguidamente se hirvieron durante 45 segundos. Las proteínas y el ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos.

- Se eliminaron los precipitados obtenidos (restos celulares y ADN cromosómico) con palillos estériles y los sobrenadantes se volvieron a precipitar con 1/10 de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y un volumen de isopropanol. Se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos y se lavaron los precipitados resultantes, que contenía los restos plasmídicos, con etanol al 70%. Se secaron los precipitados y se resuspendieron en 30 µL de TE. Se usaron 2 µL del total para el análisis por digestión de endonucleasas de restricción.

- Para llevar a cabo este protocolo se necesitaron las siguientes soluciones

Medio TB: (*Terrific Broth*). 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*. Composición: bacto triptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, glicerol 4 mL/L. Los componentes se disolvieron en 900 mL de agua destilada y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Antes de su utilización, se mezcló con 100 mL de una solución estéril de KH_2PO_4 170mM y K_2HPO_4 720 mM (266).

STET: Sacarosa 8% (p/v), Tritón 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.

7.7- Digestión del ADN con enzimas de restricción

Una vez extraído el ADN plasmídico, se llevó a cabo una digestión dirigida con diversas enzimas de restricción, como la *Eco RI*, que tienen la capacidad de reconocer dos puntos del vector utilizado en la ligación, liberando el fragmento clonado. Este proceso se realizó con el objetivo de ver mediante un gel de agarosa si se había llevado correctamente la clonación. Las enzimas de restricción fueron empleadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores (Roche y Fermentas). Cada una de ellas presentaba 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. Así mismo, es muy conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción. El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Se mezcló el tampón de la enzima de restricción (en un 1/10 del volumen total de digestión), 5 μL de ADN disuelto en tampón TE (Tris EDTA), *n* unidades de enzima que dependió de la enzima de restricción que se utilizaba y agua destilada estéril hasta completar el volumen de digestión, para cada muestra que se quería comprobar.
- Las mezclas se incubaron a la temperatura recomendada durante 2-3 horas.
- Mediante un gel de agarosa al 1,5% se comprobó si las clonaciones se habían llevado correctamente. Las condiciones de electroforesis fueron las mismas que las vistas anteriormente en la sección de PCR. En estos geles tenían que aparecer dos

bandas una de gran tamaño correspondiente al plásmido y otra de alrededor de unas 900 pb que corresponde al fragmento clonado.

7.8- Purificación de ADN plasmídico para secuenciación

La extracción y purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit comercial *Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare). Mediante este método se obtenía una extracción plasmídica más limpia que la obtenida mediante minipreparaciones.

- Se inoculó una colonia de cada transformante de *E. coli* en 1,5 mL de medio TB suplementado con el antibiótico adecuado. Las mezclas se incubaron a 37 °C con agitación (250 rpm) durante un mínimo de 6 h. (Para conseguir un rendimiento más alto se prepararon cultivos de 3 mL).
- Los inóculos se centrifugaron a la máxima velocidad (~15.000 rpm) durante 30 segundos y se descartaron cuidadosamente todos los sobrenadantes con una pipeta.
- Los pellets se resuspendieron en 200 µL de la solución I, proporcionado por el kit comercial, utilizando un vórtex. El objetivo de este paso era el lisado de las células.
- Se añadieron a continuación 200 µL de la solución II de lisis y se mezclaron inmediatamente por inversión (aproximadamente unas 5 veces) hasta que las soluciones se volvían claras y viscosas (Las reacciones de lisis no excedieron más de 5 minutos).
- Se añadieron 400 µL de la solución III (solución de neutralización) y se mezclaron inmediatamente por inversión (~10 veces), hasta que los precipitados estaban totalmente homogeneizados, para así asegurar un aislamiento plasmídico puro y de alto rendimiento. Se centrifugaron a la máxima velocidad (~15.000 rpm) durante 4 minutos.
- Los sobrenadantes se transfirieron cuidadosamente a una columna de purificación y se colocaron en un tubo eppendorf (fue importante evitar el paso de restos celulares a las columnas ya que puede afectar a la pureza en el aislamiento de los plásmidos). Se centrifugaron a la máxima velocidad durante 30 segundos y se eliminaron los eluidos.

- Lavado (opcional). Se añadieron los 400 μ L de esta solución y se centrifugaron las columnas a la máxima velocidad durante 30 segundos. Los fluidos que pasan a través de la columna se desecharon. Este paso es necesario para eliminar nucleasas potenciales y contaminación de carbohidratos.
- Se añadieron 400 μ L de la solución de lavado etanólica y se centrifugaron las muestras a la máxima velocidad durante 1 minuto. Cuidadosamente se descartaron los fluidos que pasaron a través de la columna. No debe quedar ningún resto de etanol, por tanto se volvieron a centrifugar las columnas durante 30 segundos.
- Se transfirieron las columnas de purificación a un tubo eppendorf nuevo y se añadieron 100 μ L del tampón de elución. Se incubaron durante 30 segundos y seguidamente se centrifugaron a la máxima velocidad durante 30 segundos. Los eluidos se enviaron a secuenciar al Área de Secuenciación de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (apartado 9).

8- Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)

El DGGE permite separar moléculas de ADN de doble hebra e igual tamaño, según su temperatura de fusión (T_m), la cual está directamente relacionado con su secuencia nucleotídica (269-271). Esta técnica emplea 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 la desnaturalización del ADN, 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 (272). De este modo, cuando las moléculas se desnaturalicen por efecto del gradiente, no llegarán a separarse totalmente las dos hebras y se detendrán (Figura 11). Esta técnica es capaz de separar moléculas de ADN que se diferencian en un solo nucleótido (273).

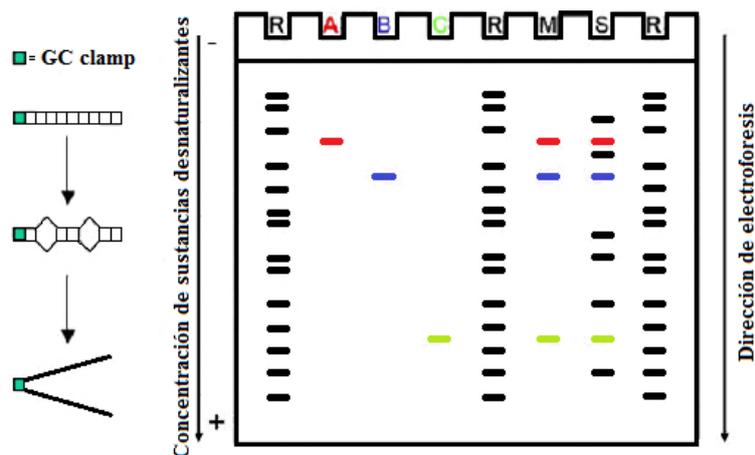


Figura 9: Esquema del fundamento de la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). Cuando el ADN se desnaturaliza queda atrapado en el gel. R: Perfil de referencia; A: Microorganismo 1; B: Microorganismo 2; C: Microorganismo 3; M y S: Muestras polimicrobianas procedentes de diferentes orígenes.

8.1- Extracción de ADN

Las muestras que se analizaron por DGGE fueron cultivos de heces en medios con gluten. Para la extracción del ADN de los cultivos celulares se llevó a cabo el kit comercial *SpeedTools Tissue DNA Extraction* (Biotools) que se describió con anterioridad en el apartado 7.1, correspondiente a extracción de ADN de cultivos. Sin embargo, en este caso cogemos 2 mL del cultivo de heces en MCG y extraemos el ADN del pellet resultante de centrifugar 15 minutos a 10.000 rpm.

8.2- Reacción de PCR-DGGE

Para llevar a cabo la técnica de DGGE, las reacciones de PCR previas se realizaron utilizando las parejas de cebadores descritos en la Tabla 7, con la peculiaridad de que uno de los oligonucleótidos porta una cola de GC en el extremo 5' (*GC-clamp*). Esta pareja de oligonucleótidos amplifica la región V3 del ADNr 16S (Anexo 1) que presenta regiones hipervariables dentro de zonas conservadas y, por tanto, se utilizan para llevar a cabo la identificación molecular. Sin embargo en pocas ocasiones permite identificar bacterias a nivel de especie, debido a que el fragmento secuenciado es muy pequeño (200 pb).

Tabla 7: Cebadores empleados para las reacciones de PCR-DGGE.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
HDA1GC	GCclamp*-ACTCCTACGGG AGGCAGCAGT		
HDA2	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	200	56

GC-clamp*: GCCGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCACGGGGG

- Para llevar a cabo las PCR 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 complejas. Las reacciones de PCR-DGGE se llevaron siguiendo el protocolo del kit para un volumen final de 20 µL. Los componentes y las concentraciones de los mismos empleados en la reacción de PCR se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Componentes y concentraciones para la reacción de PCR-DGGE en un volumen final de 25 µL empleando la enzima *Taq* polimerasa.

Componentes	Volumen	Concentración final
2x Buffer+enzima	10 µL	1x
10 µM cebador directo	0,5 µL	0,5 µM
10 µM cebador reverso	0,5 µL	0,5 µM
DMSO	1µL	NA
DNA	3 µL	20-50 ng
Agua milliQ	Hasta 20 µL	NA

- El programa de PCR que se utilizó consistió en una desnaturalización inicial de 98 °C durante 30 segundos y a partir de aquí 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 98 °C durante 10 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. El programa de PCR finalizó con una extensión a 72 °C durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4 °C.

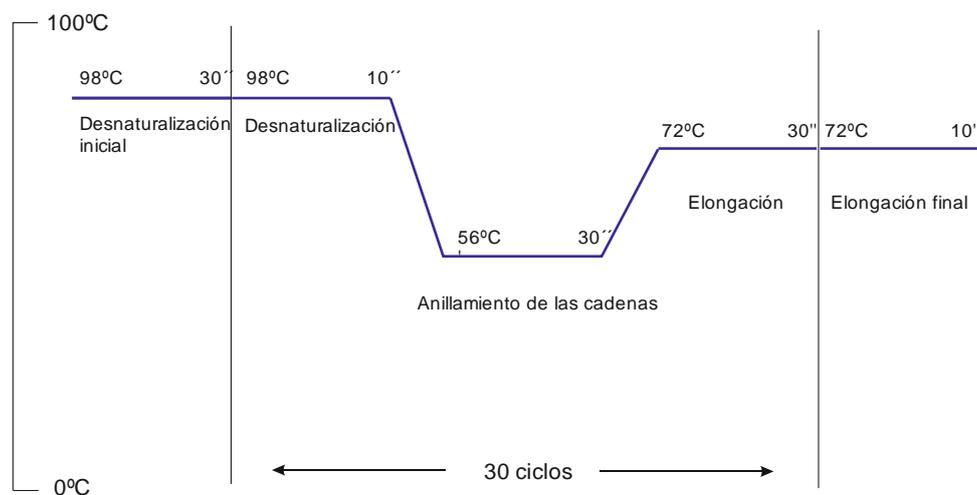


Figura 10: Ciclos que se llevaron a cabo en el termociclador para realizar la PCR-DGGE.

8.3- Elaboración de los geles de acrilamida del DGGE

La técnica del DGGE se basa en la separación de moléculas de ADN del mismo tamaño en base al momento en que se desnaturalizan. Los geles tienen una concentración de acrilamida-bisacrilamida constante que va a depender del tamaño de los fragmentos amplificados. Además, estos geles tienen un gradiente creciente de urea-formamida, agentes desnaturalizantes que van a hacer que el ADN cambie su estructura y deje de ser soluble.

- Los porcentajes de acrilamida-bisacrilamida dependen de los tamaños de ADN amplificados a separar. El tamaño de fragmento de los ADN amplificados eran de 200 pb. Utilizando la Tabla de referencia incluida en el manual del *DCODE™ Universal Mutation Detection System* (Biorad), se eligió un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida al 30%.

- La cantidad de urea y formamida de las soluciones del DGGE depende del gradiente desnaturalizante que se quiere obtener en el gel. En la Tabla 9 se muestran las cantidades de urea y formamida necesarias para generar los porcentajes de concentración del 10 al 90% en base a la Tabla de referencia incluida en el manual del *DCODE™ Universal Mutation Detection System™*. En este trabajo se llevó a cabo un gradiente desnaturalizante del 35% al 55% de acuerdo con el empleado en la bibliografía para bacterias no específicas (274).

Tabla 9: Volumen y cantidad de formamida y urea que es necesario añadir para soluciones desnaturalizantes menores del 100%.

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

- La preparación de las soluciones desnaturalizantes 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 10.

Tabla 10: Componentes empleados en la elaboración de las soluciones desnaturalizantes.

Reactivos	Solución al 35%	Solución al 55%
Acrilamida/Bisacrilamida (30%)	27 mL (8%) / 33 mL (10%)	27 mL (8%) / 33 mL (10%)
TAE 50x	2 mL	2 mL
Formamida deionizada	14 mL	22 mL
Urea	14,7 g	23,1 g
Agua destilada	Hasta 100 mL	Hasta 100 mL

- Ambas soluciones, una vez preparadas, se desgasificaron durante 10-15 minutos, se filtraron a través de un filtro de 0,45 μm y finalmente se guardaron a 4 °C (en una botella protegida de la luz hasta un mes).

- Para realizar la polimerización de la acrilamida se añadieron 50 μL de persulfato amónico (Sigma-Aldrich) al 10% y 18 μL de TEMED (N,N,N'N'-tetrametiletilendiamina) (Sigma-Aldrich). Se dejó polimerizar aproximadamente durante una hora y media a temperatura ambiente.

- El gradiente del gel se consiguió utilizando un sistema manual de ruleta proporcionado con el *DCODE™ Universal Mutation Detection System*. La correcta formación del gradiente en el gel, se comprobó añadiendo 100 μL 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).

De este modo, la parte superior del gel de acrilamida no tenía color (solución con menor concentración de soluciones desnaturalizantes sin tinte) y a medida que se descendía en el gel se iba incrementando la coloración azul.

8.4- Electroforesis del ADN en DGGE

La electroforesis de los productos de PCR en el DGGE se realizó en el aparato *DCODE™ Universal Mutation Detection System* (BioRad) con una fuente de alimentación *Power Pac 300* (BioRad).

- Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: Se empleó TAE 1X como tampón de electroforesis a una temperatura constante de 60 °C durante 15-16 horas a 70 V. El control de la temperatura fue muy importante ya que también puede actuar como factor desnaturalizante. 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 (*2X Gel Loading Dye*: Azul de bromofenol 0,05%; Xileno cianol 0,05%; glicerol 70% y agua destilada hasta 10 mL).

- Una vez completada la electroforesis, 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. Las bandas fueron visualizadas bajo un transiluminador *Quantityone, GelDoc*.

8.5- Extracción de bandas para secuenciación

Se llevó a cabo la extracción de las bandas de interés que aparecían en los geles obtenidos, mediante la técnica de DGGE, con el objetivo de identificar a que microorganismo pertenecían.

- Las bandas de interés fueron cortadas del gel de poliacrilamida con un cubre estéril bajo luz ultravioleta e incubadas en 20 µL de agua MilliQ estéril a 4 °C durante toda la noche.

- Alícuotas de 5 µL 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. Lo volúmenes y concentraciones de PCR se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Componentes y concentraciones para la reacción de PCR en un volumen final de 25 μL empleando la enzima *rTaq* polimerasa.

Componentes	Volumen	Concentración final
10x PCR tampón	2,5 μL	1x
10 mM dNTP mezcla	0,5 μL	0,2 mM de cada dNTP
10 μM cebador directo	2,5 μL	1,0 μM
10 μM cebador reverso	2,5 μL	1,0 μM
DNA molde	20-50 ng	20-50ng
<i>rTaq</i> polimerasa (5 unidades/μL)	0,2 μL	0,04 unidades/ μL
Agua MilliQ	Hasta 25 μL	NA

- El programa de PCR que se utilizó consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C durante 4 minutos y a partir de aquí 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 94 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto. El programa de PCR finalizó con una extensión a 72 °C durante 7 minutos. La reacción se mantuvo a 4 °C.

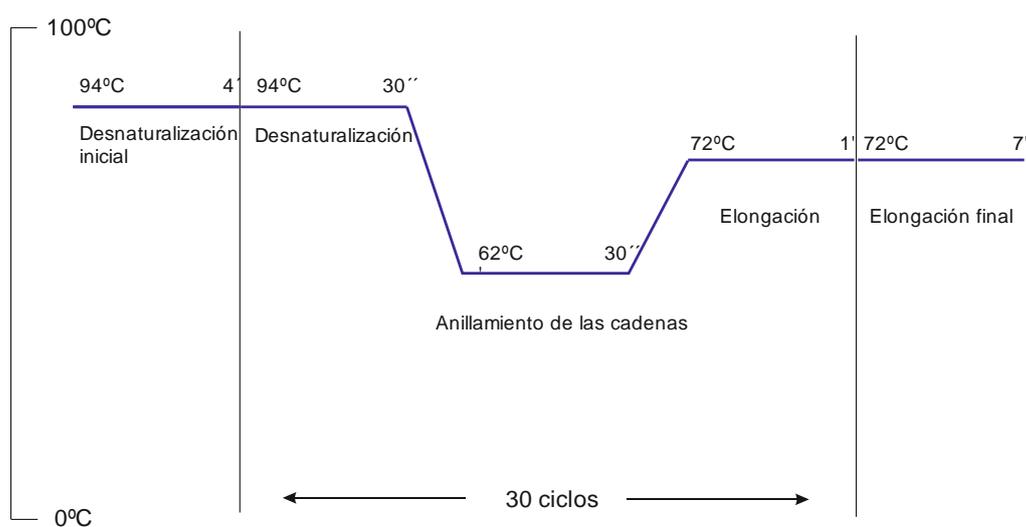


Figura 11: Ciclos que se llevaron a cabo en el termociclador para realizar la PCR de una región de ADN de 200 pb .codificante de ARNr 16S.

- Los fragmentos reamplificados fueron clonados con el sistema *StrataClone PCR Cloning* descrito en el apartado 7.4 y 7.5 para posteriormente ser purificados (apartado 7,8) y enviados a secuenciar (apartado 9).

9- Secuenciación y análisis de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó utilizando los servicios de secuenciación automática del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León con el objetivo de identificar, en la medida de lo posible, las bacterias aisladas en MCG y las bandas generadas por la PCR-DGGE. En las reacciones de secuenciación se usaron entre 300-500 ng de ADN plasmídico (en un volumen de 5-15 µL 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. Para ello se utilizó el secuenciador automático *MEGABACE 500* (Amersham Bioscience).

Una vez obtenidas las secuencias de ADN, fueron editadas y revisadas con la ayuda de los programas informáticos BioEdit y Editseq, para después llevar a cabo un análisis de las secuencias en bases de datos científicas. El alineamiento de las secuencias y el análisis filogenético de las mismas se llevó a cabo con el programa MEGA versión 5.

- El programa *BioEdit (Biological sequence alignment editor* para winXP, Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) se utilizó para abrir los cromatogramas de las secuencias obtenidas del Servicio de Secuenciación de la Universidad de León.

- El programa *EditSeq* (Lasergene, DNASTAR Inc.) permite editar los cromatogramas. Se utilizó para eliminar los restos del vector y las zonas que presentaban muchos errores.

- Una vez corregidas y revisadas las secuencias se llevó a cabo un análisis comparativo de estas secuencias 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*) (275) y más 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* (276).

- Se realizó un alineamiento múltiple de todas las secuencias estudiadas, así como 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 permitieron asegurar que las posiciones nucleotídicas comparadas son homólogas con todas las secuencias. El alineamiento se realizó utilizando el sistema *ClustalW* mediante el programa MEGA versión 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

- Para la clasificación de las secuencias estudiadas se llevó a cabo un análisis filogenético con el programa informático MEGA versión 5. Se incluyeron 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. Se construyeron árboles filogenéticos empleando el método *Minimum Evolution* (277), implementado por el programa MEGA versión 5. 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* (278), 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- Detección de gluten en heces y medios con gluten

La detección de gluten se llevo a cabo mediante el kit ELISA GlutenTox competitivo (Biomedal), capaz de detectar específicamente la presencia de la fracción tóxica de las prolaminas de trigo (gliadinas), centeno (secalinas) y cebada (hordeínas). El kit GlutenTox ELISA competitivo es un inmunoensayo ligado a enzima que se basa en la sensibilidad y especificidad del anticuerpo monoclonal G12-HRP que detecta la región QPQLPY del péptido inmunoreactivo 33-mer. Además, este ensayo permite la detección de gluten digerido o que haya sufrido procesos de proteólisis enzimática

(279, 280). El método ELISA competitivo es un modelo indirecto, de modo que a menor cantidad de gluten en la muestra, menos cantidad de anticuerpo G12-HRP queda unido a la muestra, y por tanto, más cantidad de anticuerpos se unirán a la gliadina que tapiza la placa. El anticuerpo G12-HRP se encuentra conjugado a una peroxidasa que producirá mas señal cuanto menos gluten se encuentre presente en la muestra (Figura 14). En este trabajo se utilizó el kit GlutenTox ELISA (Biomedal) para analizar la cantidad de gluten que aparecía en las heces de individuos siguiendo dietas con cantidades controladas de gluten, así como para detectar diferencias en la excreción de gluten fecal en función del diagnóstico (sanos, celíacos o familiares de celíacos). También se empleó para analizar el consumo de gluten que se producía en los MCG tras la incubación de estos con las diferentes heces a 37 °C, durante 48h, en condiciones de anaerobiosis. Para llevar a cabo el experimento se utilizó las instrucciones del kit comercial. Antes de realizar el experimento es necesario llevar a cabo un proceso de extracción de las muestras de heces.

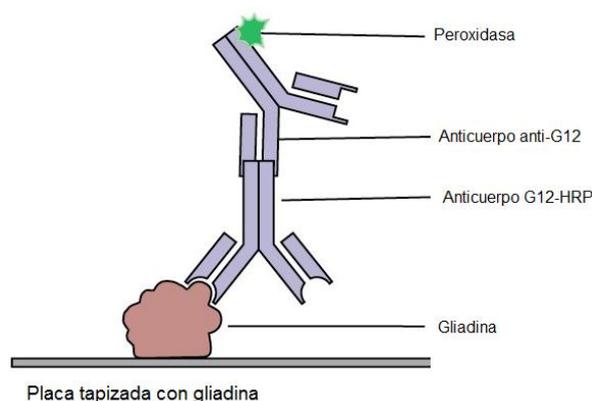


Figura 12: Esquema del fundamento de ELISA competitivo.

10.1- Extracción del gluten de las muestras

El protocolo de extracción de gluten sólo se llevó en las muestras fecales; no se realizó en las muestras de cultivo porque se demostró que este proceso incrementaba los errores en vez de mejorar la detección del kit. El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Se pesó una alícuota de cada muestra de heces y se añadió una proporción 1:10 (p/v) de la solución de extracción proporcionada por el kit. Las muestras se disolvieron en la medida de lo posible utilizando un vórtex.

- Se incubaron las muestras a 50 °C durante 40 minutos agitando el tubo periódicamente por inversión.
- Se añadió etanol al 80% en una proporción de 1:3 (v/v) y las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
- Las muestras se clarificaron por centrifugación de 6.000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes limpios se pasaron tubos estériles completamente limpios. Las muestras extraídas se analizaron con el ELISA tan pronto como fue posible.

10.2- ELISA GlutenTox competitivo

El análisis del gluten parcialmente digerido presente en las muestras fecales, así como en los cultivos tras la incubación con las muestras de heces, se llevó a cabo con un kit ELISA GlutenTox competitivo (Biomedal). El procedimiento realizado fue el siguiente:

- Se prepararon diluciones de las muestras con la solución de dilución proporcionada por el kit. Las diluciones fueron muy dependientes de la muestra que se pretendía analizar, de este modo en las heces se realizaron diluciones desde 1/20 hasta 1/500. En cambio, los cultivos en MCG de la heces requerían diluciones mayores porque se analizaban sin llevar a cabo la extracción de gluten (hasta 1/10.000)
- Se preparó el anticuerpo G12-HRP conjugado 50X diluyéndolo en el volumen apropiado de solución de dilución del kit para el número de muestras que se pretendía analizar.
- Se mezcló 150 µL del anticuerpo G12-HRP con 150 µL de las diluciones de las muestras a analizar utilizando viales de ensayo. El mismo proceso se llevó a cabo con los distintos puntos de la recta (120; 60; 30; 15; 7,5 ng/mL), el control positivo y el negativo proporcionados por el kit. Las mezclas de ensayo se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, permitiendo la unión del anticuerpo a la muestra de forma directamente proporcional a la cantidad de gluten presente.
- En la placa de ELISA se colocaron el número necesario de tiras revestidas con gluten y en ellas se añadieron 200 µL de las mezclas de ensayo (muestras diluidas,

puntos de la recta y controles). Los pocillos se cubrieron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. En esta parte el anticuerpo que no se une a la muestra queda retenido en los pocillos revestidos con gluten.

- Tras la incubación se eliminó el contenido de los pocillos y se llevaron a cabo los lavados. La solución de lavado proporcionada por el kit se diluyó diez veces en agua destilada y se añadieron 300 μL en todos los pocillos. Este proceso se repitió cuatro veces más hasta completar un total de cinco lavados. Después del último lavado se invirtió la placa y se golpeo suavemente hasta eliminar todo el líquido residual.

- Se añadieron 100 μL de la solución de sustrato proporcionada por el kit y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos protegido de la luz. Esta solución contiene el sustrato de la peroxidasa ligada al anticuerpo, junto con un cromóforo que se ve liberado tras la acción de la enzima, de modo que a mayor cantidad de anticuerpo en el pocillo (menos gluten presente en la muestra) se libera más cantidad de cromóforo.

- Se añadieron 100 μL de solución de stop en todos los pocillos para detener la reacción.

- Se leyó la absorbancia en un lector de placas a una densidad óptica de 450 nm en un plazo máximo de una hora.

- A partir de los resultados de absorbancia generados se construyó una recta patrón polinómica representando el logaritmo de las concentraciones de gliadina de cada uno de los patrones del kit (eje y) frente a las respectivas absorbancias obtenidas (eje x). Los resultados se expresaron como ppm de gluten presentes en la muestra.

11- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 18.0 para Windows. Las variables categóricas se expresaron como números y porcentajes, y las cuantitativas como medias y desviaciones estándar.

Para comparar variables cuantitativas, entre diferentes grupos, cuando los datos mostraban una distribución normal, se utilizó el test estadístico ANOVA. En cambio, se utilizó el test H de Kruskal-Wallis en aquellas poblaciones en las que no se

mostraba una distribución normal. La prueba de Kruskal-Wallis 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 de Student). La prueba U de Mann-Whitney y la prueba T de Student se utilizaron para ver si existían diferencias significativas entre dos grupos, según fuera la distribución de la población no paramétrica o paramétrica. Estos tests nos permitieron ver si existían diferencias a nivel de diagnóstico en los AGCC, las actividades enzimáticas cuantitativas (ATF, AGF, FPEP y DPPIV) y la cantidad de gluten excretada en las heces.

Para ver si existían diferencias estadísticamente significativas entre dietas, para estos mismos parámetros, se utilizó el test de Friedman. El test de Friedman permite evaluar las diferencias existentes entre varias muestras relacionadas. Para evaluar las diferencias entre dos muestras relacionadas se realizó el test de Wilcoxon. Los resultados de estos análisis fueron considerados estadísticamente significativos para valores de p menores de 0,05. Para las comparaciones dos a dos en poblaciones englobadas en más de dos grupos se llevó a cabo la corrección de Bonferroni. Por otro lado, para evaluar el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación ordinal Rho de Spearman.

El análisis estadístico del DGGE fue más complejo. 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 generadas 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 (281) 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. Para ello se utilizó el programa Tulkas (programa informático diseñado por el Dr. Luis E. Sáenz de Miera, profesor de genética de la Universidad de León).

El número de bandas de cada perfil electroforético obtenidos a partir del DGGE fue considerado como un indicador de la diversidad de la microbiota fecal. Para determinar las diferencias en la diversidad de bandas entre los grupos se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Debido a que la presencia o ausencia de bandas son variables categóricas, se determinaron las diferencias en la composición

de bandas entre los diferentes grupos de poblaciones mediante el test "Chi-cuadrado". Los resultados de estos análisis fueron considerados estadísticamente significativos para valores de p menores de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL GLUTEN EN INDIVIDUOS SANOS

Las características únicas de las proteínas del gluten hacen que la harina de trigo se encuentre presente en numerosos alimentos, convirtiéndose en uno de los cereales más consumidos en el mundo (8, 15). Se estima que la ingestión de gluten en un individuo que sigue una dieta occidental es de 13 a 15 g de gluten al día, que es una cantidad muy elevada (85). A pesar de la ubicuidad del gluten en los alimentos, existen pocos estudios sobre el metabolismo del gluten en individuos sanos. Más sorprendente es si tenemos en cuenta que el gluten es el causante de una de las intolerancias alimentarias más extendidas en la actualidad: la enfermedad celíaca (28). El objetivo de este Capítulo fue el estudio del metabolismo del gluten asociado a la actividad de la microbiota intestinal en individuos sanos. Para ello se seleccionaron 11 voluntarios sanos (con edades comprendidas entre los 25 y 45 años; media de edad 32,2 años) que llevaron a cabo distintas dietas en las que se ingerían cantidades controladas de gluten durante 15 días (Figura 1.1). Antes de comenzar la primera dieta se recogió una muestra fecal a todos los individuos que correspondió a su dieta normal (DN). El control dietético se inició con una semana en dieta estricta sin gluten (DSG). Los 4 días siguientes se mantuvo la dieta sin gluten pero los voluntarios ingirieron 9 g de gluten en polvo al día, repartidos en las tres comidas principales (DSG+9 g gluten/día). Para terminar, los voluntarios continuaron 4 días más en DSG pero se incrementó la cantidad de gluten en polvo ingerido a 30 g de gluten al día, repartidos en las tres comidas principales (DSG+30 g gluten/día). Al final de cada dieta los voluntarios proporcionaron una muestra de heces. En las muestras fecales recogidas se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

- Actividades trípica fecal (ATF), glutenásica fecal (AGF), prolilendopeptidásica fecal (PEPF) y dipeptidil peptidásica IV fecal (DPPIVF).
- Cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) excretados en las heces.
- Cuantificación del gluten que se eliminaba por las heces.
- Estabilidad del péptido 33-mer en los sobrenadantes fecales.

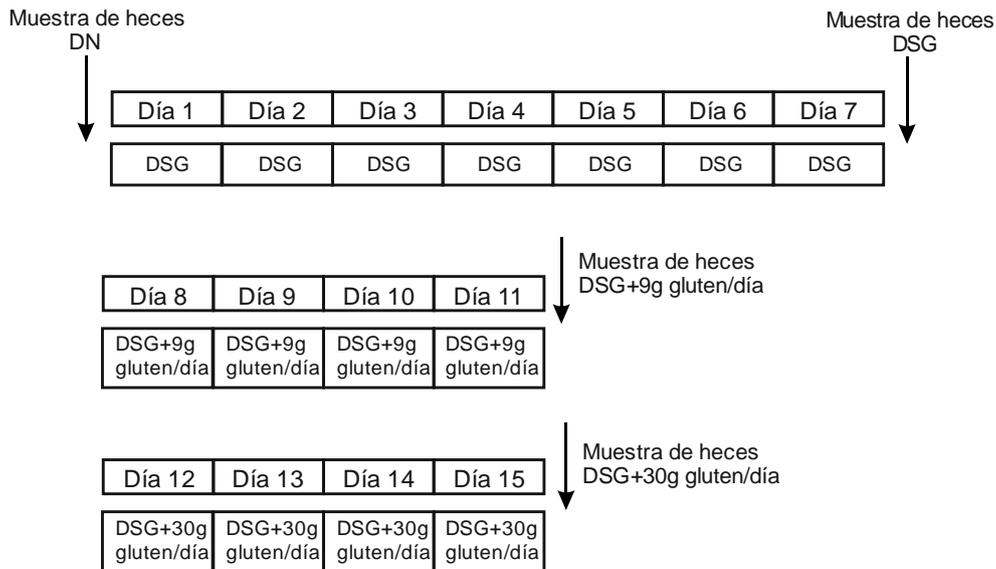


Figura 1. 1: Esquema de la dieta llevada a cabo por los 11 voluntarios sanos. El estudio consistió en una semana en dieta sin gluten (DSG), seguida de 4 días en DSG con ingesta de 9 g de gluten/día (DSG+9g gluten/día) y de otros 4 días en DSG con ingesta de 30 g gluten/día (DSG+30g gluten/día). Las muestras fecales se recogieron al final de cada dieta.

1.1- Las actividades enzimáticas fecales se incrementan a medida que se ingiere gluten en la dieta

Las proteínas del gluten ingeridas en la dieta, como todas las proteínas, sufren un proceso de digestión en el tracto digestivo que normalmente genera productos fácilmente asimilables que son aprovechados como nutrientes por el individuo. Sin embargo, las proteínas del gluten presentan regiones ricas en glutamina y prolina que les confieren resistencia a la acción de las proteasas digestivas humanas (25). Por tanto, péptidos parcialmente digeridos de las proteínas del gluten aparecen en el lumen intestinal. Estos péptidos podrían servir de sustrato para las proteasas bacterianas. En este apartado se cuantificó la ATF, la AGF, la actividad PEPF y la actividad DPPIVF en las muestras de heces correspondientes a 11 voluntarios sanos en DN, DSG, DSG+9 g gluten/día y DSG+30 g gluten/día. Los valores medios obtenidos tras la cuantificación están representados en la Figura 1.2. Los resultados muestran que los valores más bajos en las cuatro actividades enzimáticas corresponden a la DSG, y a medida que se incorpora el gluten en la dieta se produce un incremento en los valores medios de estas actividades. De este modo, se puede observar claramente que los valores más altos corresponden a las muestras fecales obtenidas en DSG+30g gluten/día. Sin embargo, no aparecen diferencias significativas

entre todas las dietas ni se encuentra ningún tipo de correlación entre las cuatro actividades enzimáticas analizadas. A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada actividad en detalle.

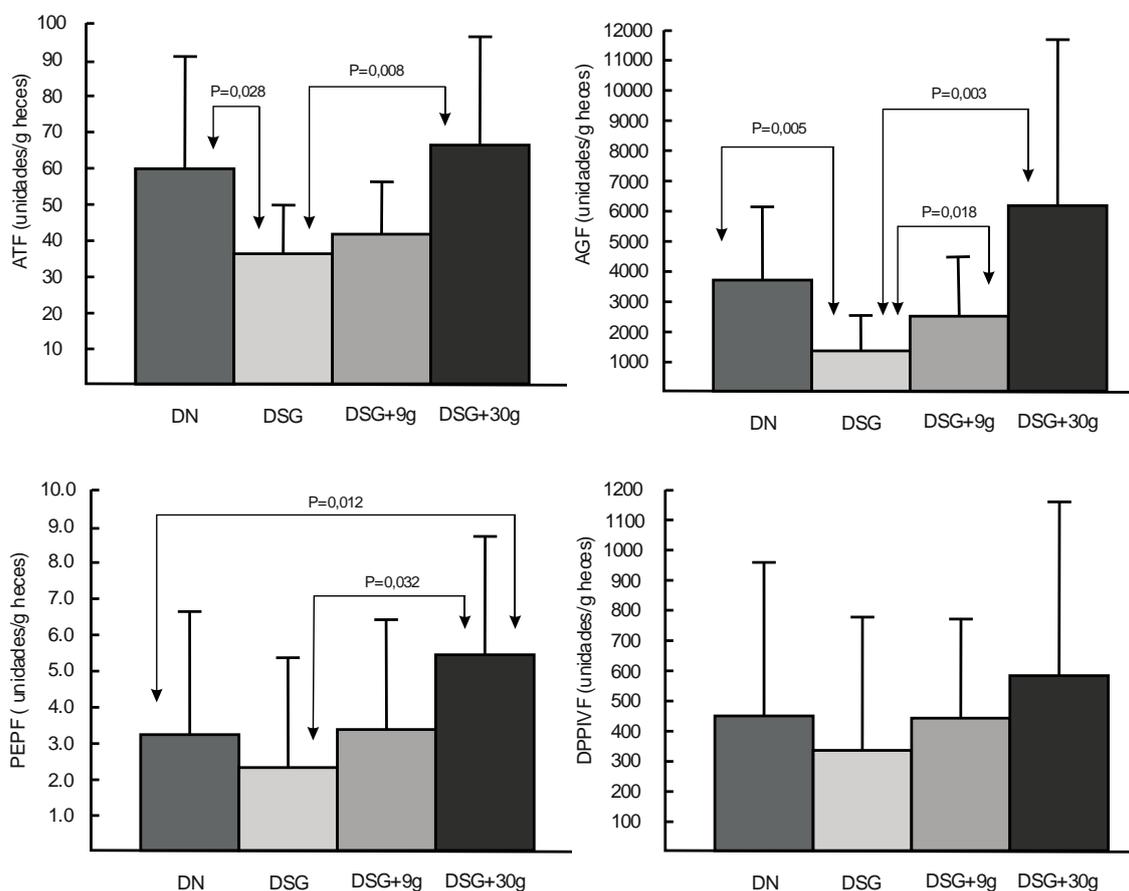


Figura 1. 2: Valores medios obtenidos de ATF, AGF, PEPF y DPPIV fecal en la población de 11 voluntarios sanos. ATF: actividad trípica fecal, AGF: actividad glutenásica fecal, PEPF: actividad proil endopeptidásica fecal, DPPIV: actividad dipeptidil peptidásica IV fecal, DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten, DSG+9g: DSG con ingesta de 9 g de gluten al día, DSG+30g: dieta sin gluten con ingesta de 30 g de gluten al día.

- **Actividad trípica fecal (ATF)**

La ATF permite estudiar de una manera indirecta la actividad metabólica de la microbiota intestinal. Esta actividad se cuantificó para estudiar la influencia de la ingesta de diferentes cantidades de gluten en la actividad de la microbiota intestinal. Para ello se analizó la ATF en las muestras de heces correspondientes a 11 voluntarios sanos en DN, DSG, DSG+9 g gluten/día y DSG+30 g gluten/día. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad trípica se incrementa a medida que

se ingiere el gluten en la dieta (Figura 1.2), de modo que los valores más bajos aparecieron en DSG y los más altos en DSG+30 g gluten/día. Así mismo, en las muestras fecales correspondientes a la dieta normal del propio individuo se observó que la ATF también es elevada. El análisis estadístico mediante el test de Wilcoxon para valores no paramétricos de muestras relacionadas, mostró diferencias estadísticamente significativas entre DSG vs DSG+30g gluten/día y entre DSG vs DN. Por tanto, en los resultados se observa un incremento significativo de la ATF cuando se aumenta el consumo de gluten en la dieta.

La tripsina es una enzima pancreática cuya función principal es la hidrólisis de péptidos y proteínas ingeridos en la dieta a componentes fácilmente aprovechables por el organismo. Está descrito que la tripsina, una vez que realiza su función hidrolítica en el duodeno, va disminuyendo su actividad a medida que entra en el intestino grueso, presumiblemente debido a proteasas microbianas capaces de inactivar la tripsina (249). Los resultados obtenidos en este trabajo podrían indicar que los voluntarios en DSG tienen en el intestino grueso una actividad proteolítica microbiana frente a la tripsina mayor que la de aquellos individuos que consumen grandes cantidades de gluten. Este hecho resulta sorprendente puesto que el gluten está formado mayoritariamente por proteínas que son parcialmente digeridas en el intestino delgado, llegando una parte importante de estas al intestino grueso (25). Los péptidos del gluten que llegan al intestino grueso podrían convertirse en sustrato para las bacterias intestinales, estimulándose la producción de proteasas de origen microbiano. Por tanto, parece más lógico que el gluten incremente la actividad de las proteasas bacterianas capaces de inactivar la tripsina en el intestino grueso. También es posible que el aumento de la ATF observado tras la ingesta de grandes cantidades de gluten esté relacionado con una mayor producción y activación de la tripsina humana en el intestino delgado. La tripsina es una proteasa que se sintetiza por las células exocrinas acinares del páncreas en forma de tripsinógeno y se activa en el duodeno donde participa en el metabolismo de proteínas. Se ha demostrado que la presencia de proteínas en el duodeno estimula la producción y activación del tripsinógeno (22), sugiriendo que el incremento de la ATF podría deberse a una mayor llegada de proteínas del gluten, provenientes de la dieta, al intestino delgado. Sin embargo, la dificultad que entraña la hidrólisis de las proteínas del gluten por parte de las enzimas digestivas humanas y la llegada de gluten parcialmente digerido al intestino grueso permite que el gluten esté disponible como sustrato para las bacterias proteolíticas del colon. Está descrito que la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal está muy influenciada por la dieta (235). Además, hay algunos

trabajos que describen la presencia en el tracto digestivo de cepas bacterianas del género *Bacteroides*, que tienen una actividad trípica similar a la que encontramos en humanos (282). Por tanto, es posible que, como consecuencia de una mayor llegada de gluten parcialmente digerido a la parte baja del tracto digestivo, el incremento en la ATF observado sea debido a una mayor producción de proteasas de origen bacteriano, similares a la tripsina, en el intestino grueso.

- **Actividad glutenásica fecal (AGF)**

La AGF es una actividad proteolítica que aparece en las heces, capaz de hidrolizar el gluten. Su origen es desconocido y se describe por primera vez en esta Tesis Doctoral. El objetivo de este apartado fue estudiar como afectaba la ingesta de gluten a la AGF. Para ello se midió la AGF en las muestras fecales de 11 voluntarios sanos en DN, DSG, DSG+9 g gluten/día y DSG+30 g gluten/día. Los resultados muestran que la AGF se duplica cuando los individuos pasan de DSG a DSG+9g gluten/día y se incrementa la actividad seis veces cuando hay una sobrecarga de gluten en la dieta (DSG+30g gluten/día) (Figura 1.2). Cuando se comparan los valores de AGF entre la DSG y la DN se observa que la actividad aumenta 3,5 veces. Los análisis estadísticos mediante el test de Wilcoxon mostraron que estas diferencias son significativas, pudiendo concluir que la AGF se incrementa proporcionalmente a medida que se ingiere gluten en la dieta.

El origen de la AGF que se detecta en esta Tesis Doctoral es desconocido. Todos los componentes de la dieta que escapan a la digestión en el intestino delgado son sustratos potenciales para las bacterias del tracto digestivo bajo (219). Éste es el caso de las proteínas del gluten. La resistencia de algunas regiones de las proteínas del gluten a las enzimas digestivas humanas permite la llegada de gluten parcialmente hidrolizado al intestino grueso (25). El intestino grueso se caracteriza por presentar una microbiota diversa que es responsable de la conversión de muchas sustancias no asimilables en nutrientes. La diversidad genética de la microbiota intestinal produce multitud de enzimas y rutas bioquímicas distintas a las que se encuentran en el hospedador, permitiendo así la recuperación de parte de la energía consumida durante la comida (213, 214). Además, en el intestino grueso aparecen bacterias proteolíticas capaces de aprovecharse de los restos peptídicos no digeridos en el intestino delgado (144). Precisamente, en las heces humanas se han aislado cepas bacterianas de la especie *Bacteroides fragilis* con actividad gliadinásica, así como cepas de *Bifidobacterium* como *B. longum* IATA-ES1, *B. animalis* IATA-A2 y *B. bifidum* IATA-

ES2 capaces de hidrolizar péptidos del gluten (110, 237). Por tanto, la AGF que detectamos en este estudio podría provenir de la actividad proteolítica frente a las proteínas del gluten de las bacterias que se encuentran en el intestino grueso. Además, los resultados obtenidos en este apartado mostraron que la AGF es proporcional al consumo de gluten dietético. La dieta es el principal factor ambiental que influye en la diversidad y la funcionalidad de la microbiota intestinal (235). En un estudio reciente se ha mostrado que la retirada del gluten de la dieta en voluntarios sanos disminuye la proporción de bacterias fecales pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* (236). Resultados similares se obtuvieron en pacientes celíacos donde también se observaba una reducción de estos grupos bacterianos en pacientes tratados con respecto a pacientes con EC activa (246, 248). Aunque en estos estudios no se comprobó la capacidad hidrolítica frente al gluten, se han aislado cepas bacterianas incluidas en estos géneros que presentan actividades proteolíticas frente a péptidos del gluten. Por tanto, el consumo de gluten podría afectar a la actividad proteolítica microbiana en el intestino grueso y detectarse indirectamente por la AGF.

- ***Actividad prolilendopeptidásica fecal y dipeptidil peptidásica IV fecal (PEPF y DPPIVF)***

Las actividades PEP y DPPIV son actividades enzimáticas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos que presentan residuos de prolina (257, 258). La DPPIV escinde los dos últimos restos aminoacídicos por el extremo N-terminal cuando aparece un residuo de prolina en la segunda posición (283). En cambio, la actividad PEP hidroliza péptidos con residuos de prolina desde el extremo carboxilo (96, 259). El análisis de estas actividades se llevó a cabo para estudiar el posible papel de la PEPF y la DPPIVF en el metabolismo del gluten. Se cuantificaron las dos actividades enzimáticas en las muestras fecales de 11 voluntarios sanos en DN, DSG, DSG+9 g gluten/día y DSG+30 g gluten/día. Los valores medios obtenidos en las distintas dietas están representados en la Figura 1.2. Se puede observar que ambas actividades enzimáticas parecen incrementarse cuando se aumenta la ingesta de gluten en la dieta. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que sólo había diferencias significativas para la PEPF. Los individuos en sobrecarga de gluten (DSG+30g gluten/día) presentaban un incremento significativo en la PEPF con respecto a la DN y a la DSG, sugiriendo que esta actividad aumenta tras la ingesta de grandes cantidades de gluten en la dieta.

La PEPF y la DPPIVF aparecen ampliamente distribuidas en los tejidos y fluidos de los mamíferos. Además, estas actividades enzimáticas también han sido descritas en diversas bacterias y hongos (262, 284, 285). En el tracto gastrointestinal la actividad DPPIV aparece en las peptidasas del cepillo intestinal (158). Sin embargo, se ha descrito que las proteasas digestivas humanas carecen de actividad PEP, motivo por el cual las proteínas del gluten sólo sufren una degradación parcial en el duodeno (25). La resistencia del gluten a las enzimas digestivas del duodeno permite la llegada de péptidos ricos en prolina al intestino grueso, donde pueden ser atacados por las bacterias proteolíticas intestinales. En este trabajo se muestra la presencia de actividad DPPIVF y actividad PEPF en las muestras fecales de voluntarios sanos. Esto parece indicar que las actividades enzimáticas, como ocurre con la AGF, provienen del metabolismo microbiano intestinal. En concordancia con estos resultados, se ha descrito la presencia de cepas de *Lactobacillus helveticus* o *Streptococcus suis*, con actividad PEP y DPPIV respectivamente, que pueden proliferar en el intestino grueso (286, 287). Además, debido a la capacidad para degradar péptidos con prolina, estas actividades son candidatas a participar en la degradación del gluten en el tracto gastrointestinal (257). Aunque ambas actividades se ven incrementadas cuando se ingieren grandes cantidades de gluten, sólo aparecen diferencias significativas para la PEPF, indicando que ésta es la única actividad enzimática que se ve influenciada claramente por el consumo de gluten en la dieta.

1.2- Los ácidos grasos de cadena corta fecales aumentan cuando hay grandes ingestas de gluten en la dieta

Los AGCC son los principales aniones que surgen de la fermentación bacteriana de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, péptidos y glucopéptidos en el colon (216-218). Los precursores de los AGCC se ingieren como alimentos en la dieta y llegan al intestino grueso donde la microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica que genera AGCC entre otros metabolitos (165). Por tanto, los AGCC permiten estudiar de una manera indirecta la actividad metabólica de la microbiota intestinal. La cuantificación de los AGCC en este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de estudiar los posibles cambios que se producían en el metabolismo microbiano intestinal de los 11 voluntarios sanos en DN, DSG, DSG+9 g gluten/día y DSG+30 g gluten/día. Los resultados obtenidos están representados en la Tabla 1.1. Se puede observar que el AGCC mayoritario es el ácido acético seguido por el ácido propiónico y el ácido butírico. En cambio los ácidos grasos que poseen una cadena más larga (por ejemplo el ácido valérico con cinco átomos de carbono o el hexanoico

con seis) y los AGCC ramificados (ácido isobutírico y ácido isovalérico) aparecen en concentraciones menores.

Tabla 1. 1: Valores medios de concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en las muestras fecales de 11 voluntarios sanos en las distintas dietas de estudio. DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten, DSG+9g: DSG con ingesta de 9 g de gluten al día, DSG+30g: dieta sin gluten con ingesta de 30 g de gluten al día.

<i>Tipo de AGCC</i>	<i>DN</i>	<i>DSG</i>	<i>DSG + 9 g gluten/día</i>	<i>DSG+30 g gluten/día</i>
Ácido Acético*	24,60±9,18	20,60±10,46	31,21±25,15	43,67±21,88**
Ácido Propiónico*	7,05±3,21	5,82±2,27	8,66±5,72	11,70 ±3,07**
Ácido Isobutírico*	0,98±0,38	0,90±0,49	1,01±0,48	1,43±0,34**
Ácido Butírico*	5,33±2,84	4,22±2,15	6,17±4,89	9,70±4,77**
Ácido Isovalérico *	1,36±0,62	1,18±0,55	1,25±0,66	1,72±0,65
Ácido Valérico*	0,97±0,46	0,77±0,42	1,03±0,49	1,59±0,38**
Ácido Hexanoico*	0,44±0,34	0,36±0,33	0,35±0,32	0,7±0,55**

*Media de las 11 muestras (mmol/Kg heces)

** Diferencias significativas con respecto a DSG: p <0.01

Al analizar la Tabla 1.1, se observa un incremento en la concentración de todos los AGCC fecales al incorporar el gluten en la dieta. Sin embargo, estas diferencias sólo son estadísticamente significativas cuando se compara la DSG con la introducción de una sobrecarga de gluten en la dieta (DSG+30g de gluten/día). Por otro lado, cuando se cotejan los resultados de cada AGCC obtenidos en DSG con respecto a los obtenidos en DN se observa que apenas se detectan variaciones. Estos resultados se pueden ver de una manera más gráfica en la Figura 1.3, donde se representan los AGCC totales en las diferentes condiciones dietéticas analizadas. Se puede observar que los valores más altos de AGCC totales aparecen en la dieta con sobrecarga de gluten. En cambio, los más bajos se encuentran en DSG y DN. El análisis estadístico reveló que existían diferencias estadísticamente significativas entre DSG vs DSG+30 g gluten/día y entre DN vs DSG+30 g gluten/día.

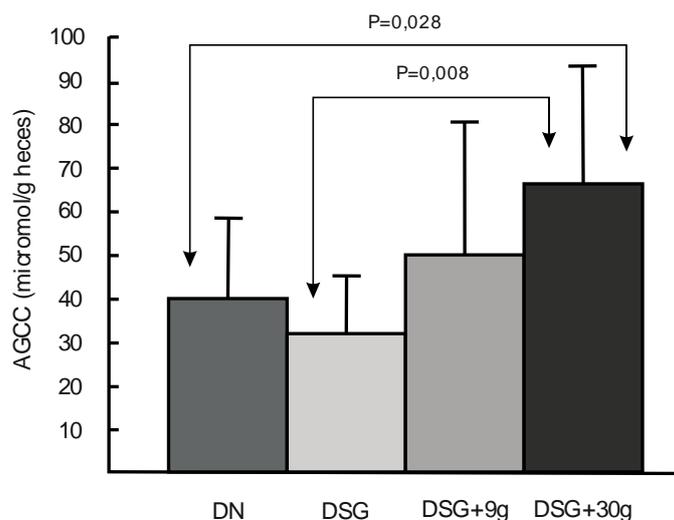


Figura 1. 3: Valores medios de concentración de AGCC totales en las muestras fecales de 11 voluntarios sanos en las distintas dietas. AGCC: ácidos grasos de cadena corta, DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten, DSG+9g: DSG con ingesta de 9 g de gluten al día, DSG+30g: dieta sin gluten con ingesta de 30 g de gluten al día.

Aunque las proteínas del gluten son relativamente resistentes a la proteólisis en el tracto digestivo y podrían ser sustrato del metabolismo microbiano en el intestino grueso, nuestros resultados sugieren que no hay una influencia muy fuerte del gluten en la producción de los AGCC, puesto que los valores obtenidos en DSG son similares a los de DN. Se ha descrito que los sustratos más importantes en la formación de los AGCC por fermentación bacteriana son los hidratos de carbono, principalmente fibras y almidones resistentes. Por el contrario, el gluten está formado mayoritariamente por proteínas, que se sabe, juegan un papel minoritario. Aunque los componentes proteicos también pueden participar en menor medida en la formación de los ácidos grasos mayoritarios, las proteínas son los precursores exclusivos de AGCC ramificados como el ácido isovalérico y el ácido isobutírico (217). En este trabajo no se detectaron diferencias significativas entre DSG y DN. La baja participación de las proteínas en la concentración de AGCC fecales puede ser la explicación de que no aparezcan diferencias en los AGCC cuando se retira el gluten de la dieta. Sin embargo, cuando la DSG se suplementa con 30 g gluten/día se produce un incremento significativo de la mayoría de los AGCC. Esto se podría deber a que, además de proteínas, el gluten contiene entre un 5-10% de lípidos e hidratos de carbono no solubles en agua que podrían ocasionar un aumento considerable de los

AGCC cuando se consume una gran cantidad de gluten. No obstante, los ácidos grasos ramificados también aparecieron aumentados en DSG+30 g gluten/día, mostrándose diferencias significativas entre DSG vs DSG+30 g gluten/día para el ácido isovalérico. Por tanto, las proteínas del gluten también pueden afectar al metabolismo microbiano intestinal tras un elevado consumo de gluten en la dieta.

1.3- La cantidad de gluten que se detecta en las heces está relacionado con su consumo en la dieta

La resistencia de los péptidos del gluten a las enzimas digestivas humanas permite la llegada de gluten parcialmente digerido al intestino grueso. Como se observó en los resultados previos, en el intestino grueso se genera una intensa actividad proteolítica capaz de hidrolizar los péptidos del gluten. El objetivo de este apartado fue cuantificar el gluten que era capaz de atravesar el tracto gastrointestinal excretándose por las heces. Para ello, se determinó el gluten presente en las heces de 11 voluntarios sanos en DN, DSG, DSG+9 g gluten/día y DSG+30 g gluten/día. La cantidad media de gluten fecal para las cuatro dietas analizadas está representada en la Figura 1.4. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de gluten detectados en las heces están relacionados con la ingesta de éste en la dieta. De este modo, en las heces de los voluntarios sanos en DSG no se detectó gluten, y a medida que el gluten se introducía en la dieta la excreción fecal de éste aumentaba proporcionalmente. En DSG+9 g gluten/día se detectó una concentración media de 580 ppm de gluten en las heces, mientras en DSG+30 g de gluten/día la concentración media fue de 1630 ppm, aproximadamente 3 veces más. La DN de los individuos analizados se caracterizó por la presencia de una concentración de gluten fecal elevada (media 1060 ppm), aunque los resultados individuales fueron muy dispersos dependiendo del individuo. Todas las dietas con gluten mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la DSG, y además se obtuvieron diferencias significativas entre DSG+9 g gluten/día vs DSG+30g gluten/día.

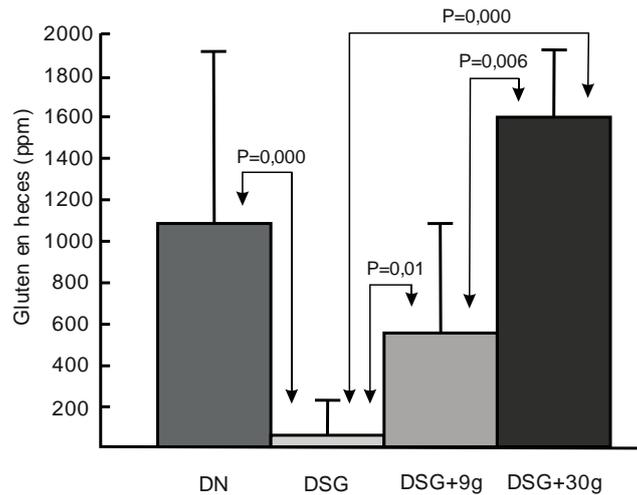


Figura 1. 4: Valores medios obtenidos de la cuantificación del gluten fecal de 11 voluntarios sanos en las distintas dietas. DN: dieta normal DSG: dieta sin gluten, DSG+9g: DSG con ingesta de 9 g de gluten al día, DSG+30g: dieta sin gluten con ingesta de 30 g de gluten al día.

Los componentes de origen proteico ingeridos en la dieta, al llegar al duodeno, son digeridos a productos de menor tamaño por las enzimas pancreáticas y del cepillo intestinal. Estos productos de la degradación proteolítica se absorben por los enterocitos para cubrir las necesidades nutricionales de aminoácidos requeridas por los seres humanos. Sin embargo, resultados previos sugieren que el gluten no es completamente asimilado en el intestino (143). La asimilación incompleta de proteínas ya ha sido demostrada previamente con otras proteínas dietéticas, incluso en proteínas fácilmente digeribles como las proteínas del huevo (120, 121). Además, el componente proteico de gluten presenta regiones ricas en glutamina y prolina que le confieren resistencia frente a las enzimas digestivas humanas, debido a la ausencia de actividad prolilendopeptidásica en el intestino (25). De modo que los péptidos del gluten no absorbidos en el intestino delgado llegan al intestino grueso donde, como hemos visto anteriormente, se genera una intensa actividad proteolítica frente a las proteínas del gluten. Sin embargo, esta actividad parece insuficiente para hidrolizar el gluten completamente durante su tránsito por el intestino grueso y, como consecuencia, en las heces se detecta gluten parcialmente digerido. Los resultados obtenidos en este apartado muestran que el gluten que se detecta en las heces es proporcional al gluten ingerido en la dieta. Por tanto, parte del gluten consumido en la dieta atraviesa el tracto digestivo sin ser completamente digerido y se elimina por las heces.

1.4- La capacidad de las heces de digerir 33-mer es independiente de la dieta pero está relacionada con la AGF

El péptido 33-mer de la α -gliadina es uno de los péptidos más inmunotóxicos en la enfermedad celiaca. El objetivo de este apartado fue comprobar si los sobrenadantes de las heces presentaban actividades peptidásicas capaces de hidrolizar el péptido 33-mer. Para ello, se incubaron las muestras fecales de los voluntarios sanos en DN y DSG con el 33-mer a distintos tiempos ($t=2h$, $t=6h$, $t=8h$ y $t=12h$), y la estabilidad del péptido 33-mer fue posteriormente analizada mediante HPLC (Figura 1.5). Se consideró que el péptido estaba hidrolizado cuando se reducía el área de pico al menos un 90%. Los resultados obtenidos (Figura 1.6 A) mostraron que la actividad proteolítica de las heces frente a este péptido es dependiente del individuo y no de la dieta llevada a cabo por el voluntario. De este modo, se detectó que uno de los individuos analizados era capaz de degradar el 33-mer a las 6 horas (9,1%), dos a las 8 horas (18,2%), cuatro de ellos a las 12 horas (36,4%) y otros 4 no fueron capaces de hidrolizar el péptido durante las 12 horas que duró la incubación (Figura 1.6 B). Es importante mencionar que las muestras en DSG incubadas con el 33-mer generaron exactamente los mismos cromatogramas que las muestras en DN correspondientes a cada individuo. Además, los productos generados tras la degradación del péptido 33-mer por los sobrenadantes fecales a distintos tiempos fueron característicos de cada individuo. Por tanto, no se detectaron diferencias en la actividad hidrolítica del 33-mer por parte de las heces en función de la dieta, pero si en función del individuo.

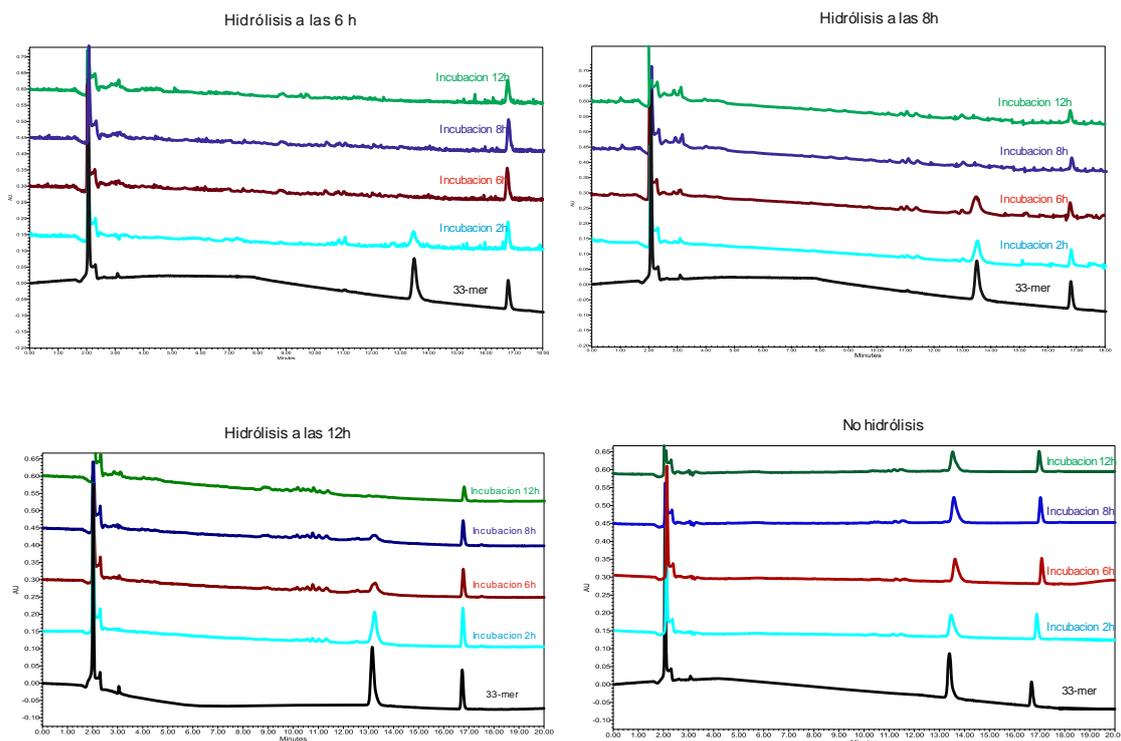


Figura 1. 5: Cromatogramas de cuatro muestras fecales en DN incubadas con el péptido 33-mer a distintos tiempos (2h, 6h, 8h y 12 h). El pico que corresponde al 33-mer aparece en torno al minuto 13. Se considera la hidrólisis del péptido cuando el área de pico se reduce a menos de un 10%. DN: dieta normal.

Si se compara la actividad proteolítica frente al 33-mer presente en las heces con las actividades proteolíticas fecales analizadas con anterioridad, se puede ver que no existe una correlación significativa entre ninguna de las actividades. Sin embargo, si se observa que las muestras fecales que presentan una mayor AGF en DN son capaces de hidrolizar el péptido 33-mer en menos tiempo (Figura 1.6 A). La AGF es una actividad proteolítica de origen desconocido que es característica de cada individuo. Esta actividad detectada en las heces podría proceder de la acción conjunta de varias proteasas intestinales. Por lo que es posible que alguna o algunas de las proteasas que participan en la actividad glutenásica sean capaces de hidrolizar el 33-mer. Por tanto, aquellos individuos que presentan una AGF elevada es más probable que muestren una mayor actividad hidrolítica frente al 33-mer. No obstante, el tamaño muestral analizado es muy pequeño para obtener resultados claros. Además, hemos visto que la retirada del gluten de la dieta afecta a la AGF pero no a la actividad

hidrolítica frente al 33-mer. Esto muestra que aunque estas actividades pueden estar relacionadas, realmente son actividades enzimáticas distintas.

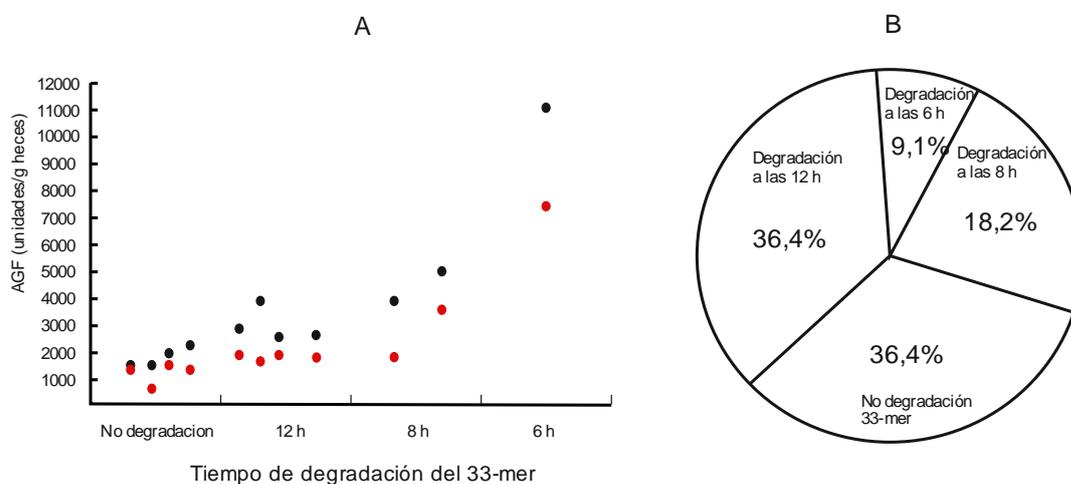


Figura 1. 6: A, Correlación entre los valores obtenidos de AGF con los obtenidos de actividad peptidásica frente al 33-mer. Los puntos negros corresponden a los valores de AGF obtenidos en DN, debajo de cada punto negro aparece otro punto rojo que corresponde al valor de la AGF en DSG del mismo paciente. B, Diagrama sectorial del porcentaje de muestras fecales con actividad proteolítica frente al 33-mer para los diferentes tiempos de incubación.

Estudios *in vitro* han mostrado que péptidos capaces de desencadenar la respuesta inmune en pacientes celíacos, como el péptido 33-mer, son resistentes a las enzimas digestivas humanas presentes en el intestino delgado. Estos péptidos permanecen en el lumen intestinal desencadenando el proceso inflamatorio característico de la EC en pacientes genéticamente susceptibles. Los péptidos del gluten no digeridos en el duodeno llegan al intestino grueso donde, como hemos visto anteriormente, aparece una intensa actividad proteolítica frente al gluten. Los resultados obtenidos en este apartado manifiestan que muchos de los sobrenadantes fecales son capaces de hidrolizar el 33-mer en mayor o menor medida, de modo que en el colon se puede generar una actividad proteolítica diferente a la producida por las proteasas digestivas humanas en el intestino delgado. El intestino grueso se caracteriza por presentar una microbiota diversa capaz de producir rutas bioquímicas diferentes a las que se encuentran en el hospedador (213, 214). Por tanto, la capacidad hidrolítica frente al 33-mer que detectamos en las muestras fecales parece provenir de la actividad metabólica microbiana en el intestino grueso. La caracterización de estas bacterias capaces de degradar el péptido 33-mer es

interesante debido a que estos microorganismos pueden tener importancia en el tratamiento de la enfermedad celiaca, bien como probióticos o como terapia enzimática oral.

1.5- Discusión general

El trigo es uno de los cereales más consumidos en todo el mundo gracias a las características únicas de viscoelasticidad que les aporta el gluten (15). Por esta razón, la harina de trigo, y más concretamente el gluten, se encuentra presente en numerosos alimentos y su eliminación de la dieta es realmente complicada. Todas las proteínas consumidas en la dieta, incluidas las proteínas del gluten, sufren un proceso digestivo a lo largo del tracto gastrointestinal hasta generar productos fácilmente asimilables (22). Aunque se considera que la digestión significativa de proteínas empieza en el estómago por acción de la pepsina, la cavidad oral presenta una actividad proteolítica frente al gluten de origen bacteriano que podría participar en el metabolismo del gluten (136). No obstante, va a ser en el intestino delgado donde se produce la degradación principal de las proteínas de la dieta por acción de las enzimas pancreáticas y del cepillo intestinal (22). Como resultado, se generan aminoácidos y pequeños péptidos de 2 o 3 aminoácidos que pueden ser transportados al interior del enterocito. Sin embargo, estudios *in vitro* han mostrado que el gluten sólo es parcialmente hidrolizado por las enzimas digestivas humanas del tracto gastrointestinal. Ésto es debido a que el gluten presenta en su secuencia aminoacídica regiones ricas en glutamina y prolina que juegan un papel crítico en la protección de los péptidos frente a la degradación proteolítica (24). La capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos en los que participan residuos de prolina es producido, entre otras, por la actividad prolilendopeptidásica, y las enzimas proteolíticas humanas presentes en el tubo digestivo carecen de esta actividad (23, 24).

Muchos alimentos ingeridos en la dieta, como el gluten, no son digeridos completamente por las enzimas proteolíticas del duodeno. Estos alimentos atraviesan el intestino delgado hasta llegar al intestino grueso donde está descrita una población microbiana diversa. Con frecuencia se subestima el papel de la microbiota intestinal en la hidrólisis de proteínas difícilmente digeribles por las proteasas humanas. Aunque no se ha demostrado *in vivo* todavía, hay razones para pensar que la microbiota intestinal no sólo tiene un papel importante en la digestión de proteínas en el intestino grueso, sino también en el intestino delgado (122). El metabolismo microbiano es responsable de la conversión de muchas sustancias no asimilables a nutrientes que pueden ser

absorbidos y utilizados por el huésped (213). La composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal está muy influenciada por los componentes dietéticos ingeridos en el hospedador (235), de modo que la presencia de gran cantidad de gluten en la alimentación occidental, junto con la resistencia de éste a las enzimas digestivas humanas, hacen que el gluten pueda ser sustrato del metabolismo microbiano en el intestino. Precisamente, De Palma G *et al.* (236) mostraron que individuos sanos en DSG durante un mes presentaban un desequilibrio en las poblaciones bacterianas fecales de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterobacteriaceae*. Además, se han descrito cepas bacterianas fecales, pertenecientes al grupo de las bifidobacterias, capaces de hidrolizar péptidos de gluten (146). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo también parecen indicar que el gluten puede ser aprovechado por la microbiota intestinal. En esta Tesis Doctoral se describe por primera vez una intensa actividad proteolítica frente al gluten, que denominamos AGF, y al menos 2 actividades proteolíticas diferentes que reconocen enlaces peptídicos en los que participa la prolina (PEPF y DPPIVF). La AGF, y en menor medida la PEPF, están influenciadas por la ingesta de gluten en la dieta. Aunque estas actividades son de origen desconocido, todo parece indicar que provienen del metabolismo microbiano que tiene lugar en el intestino grueso. Precisamente, estudios previos han mostrado la ausencia de actividad PEP en las enzimas digestivas humanas como la que cuantificamos en heces, impidiendo la digestión completa de péptidos ricos en prolina. En las heces también se ha detectado una actividad proteolítica frente al 33-mer, un péptido resistente a la digestión intestinal humana capaz de activar la respuesta inmune en pacientes celíacos. Por lo tanto, en el intestino grueso se pueden hidrolizar péptidos del gluten que no pueden ser degradados por las enzimas digestivas humanas.

La intensa actividad proteolítica degradadora de gluten detectada en las heces puede generar péptidos absorbibles en el intestino grueso. Aunque el intestino delgado es la principal zona de absorción de proteínas, se ha descrito que el intestino grueso también puede participar en la asimilación (22). Sin embargo, la parte baja del tracto digestivo parece que sólo es capaz de absorber péptidos en el período postnatal y en determinadas patologías (122). El transportador PEPT1 no se expresa en el colon sano de humanos y los estudios de transporte de aminoácidos en el intestino grueso de mamíferos no muestran resultados concluyentes (126-130, 288). Por tanto, los péptidos y aminoácidos generados por las proteasas bacterianas podrían no ser aprovechados por el hospedador. El destino principal de estos compuestos proteicos será el metabolismo microbiano. Como consecuencia del metabolismo bacteriano de aminoácidos en el colon se generan AGCC y otros compuestos nitrogenados que

pueden tener diferentes efectos sobre el hospedador. En este trabajo se observó que la ingesta de grandes cantidades de gluten es capaz de incrementar la producción de AGCC, por lo que parece lógico que las bacterias se estén aprovechando de los componentes proteicos que llegan al intestino grueso.

A pesar de las actividades proteolíticas detectadas en las heces y a la intensa actividad metabólica de las bacterias en el colon, el gluten tampoco se digiere completamente en el intestino grueso (143). En este trabajo se cuantificó el gluten excretado por las heces en individuos sanos que ingerían cantidades controladas de gluten en la dieta. Los resultados obtenidos mostraron que la cantidad de gluten que se detecta en las heces es proporcional al gluten consumido. Por tanto, al menos una parte del gluten ingerido en la dieta se excreta en las heces sin ser aprovechado por el hospedador. Además, hay una correlación entre la ingesta de gluten, la AGF y el gluten eliminado por las heces. En definitiva, el consumo de gluten en la dieta es capaz de generar una intensa actividad proteolítica en el intestino de los voluntarios sanos que no es suficiente para llevar a cabo la hidrólisis completa de los péptidos del gluten, eliminándose parte de éste por las heces.

2. ESTUDIO COMPARADO ENTRE EL METABOLISMO DEL GLUTEN EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado que aparece en individuos genéticamente susceptibles y es causada por una respuesta inmune inapropiada a las proteínas del gluten del trigo, así como a otras proteínas similares presentes en la cebada y en el centeno (31). Aunque el gluten es el factor desencadenante de la enfermedad, hay pocos trabajos que estudien el metabolismo de estas proteínas en pacientes con EC. Este Capítulo se centró en el análisis comparativo de la actividad metabólica microbiana entre voluntarios sanos y pacientes celíacos. Para ello, se seleccionaron 16 voluntarios sanos en DN (rango de edades 25-45 años y media 30,1), 11 individuos sanos que siguieron una dieta estricta sin gluten durante una semana (rango 25-45 años y media 32,2), 22 enfermos celíacos activos (rango 15-60 años y media 39,5) y 18 pacientes celíacos tratados con una DSG durante al menos un año (rango 24-42 años y media 30,6). Cada uno de los voluntarios proporcionó una muestra de heces en las que se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

- Actividades triptica fecal (ATF), glutenásica fecal (AGF), prolilendopeptidásica fecal (PEPF) y dipeptidil peptidásica IV fecal (DPPIVF).
- Cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) excretados en las heces.
- Cuantificación del gluten que se eliminaba por las heces.
- Estabilidad del péptido 33-mer en los sobrenadantes fecales.

2.1- Aparecen diferencias significativas entre los distintos grupos analizados en las actividades glutenásica fecal y triptica fecal

Durante mucho tiempo se pensó que la EC se debía a una digestión anómala del gluten causada por una deficiencia enzimática en el intestino de los pacientes celíacos. Aunque actualmente se acepta que la digestión de gluten es incompleta en cualquier persona, hay varios trabajos que describen una alteración en la actividad de

las peptidasas intestinales en pacientes celiacos (155, 156). En este apartado se cuantificó la AGF, la actividad PEPF y la actividad DPPIVF, que podrían participar en el metabolismo del gluten. Además, se analizó la ATF con el objetivo de estudiar la actividad de la microbiota intestinal. Los valores obtenidos tras la cuantificación de las actividades enzimáticas en las heces de 16 voluntarios sanos en DN, 11 individuos sanos en DSG, 22 enfermos celiacos activos y 18 pacientes celiacos tratados están representados en la Figura 2.1. Se analizó mediante el test H de Kruskal-Wallis para valores no paramétricos si existían diferencias significativas entre las actividades enzimáticas analizadas para varias muestras independientes. Los resultados muestran que hay diferencias estadísticamente significativas en la AGF y la ATF entre las distintas poblaciones.

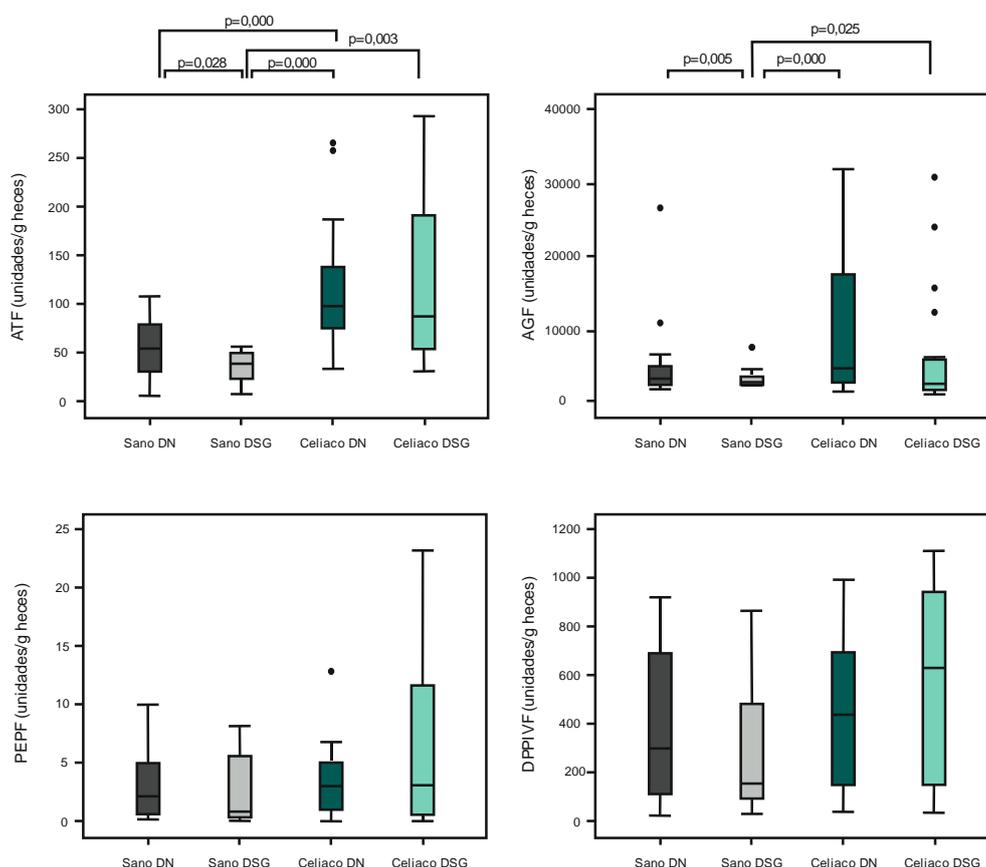


Figura 2. 1: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de las actividades enzimáticas analizadas en las muestras de voluntarios sanos en DN, voluntarios sanos en DSG, pacientes celiacos en DN y pacientes celiacos en DSG. ATF: actividad trípica fecal, AGF: actividad glutenásica fecal, PEPF: actividad proil endopeptidásica fecal, DPPIVF: actividad depeptidil peptidásica IV fecal, DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten.

- **Actividad trípica fecal (ATF)**

La ATF es un método indirecto que permite estudiar la actividad de la microbiota intestinal. Esta actividad se cuantificó con la finalidad de detectar posibles variaciones en la actividad metabólica de la microbiota intestinal entre voluntarios sanos y pacientes celíacos en DN y DSG. En la Figura 2.1 se puede observar que los valores de mediana de ATF en pacientes celíacos son superiores a los valores de mediana en voluntarios sanos. Mediante el test U de Mann-Whitney para valores no paramétricos se analizaron las diferencias existentes entre los grupos poblacionales por pares. Los resultados mostraron que había diferencias estadísticamente significativas entre: pacientes celíacos en DN vs sanos en DN, pacientes celíacos en DSG vs sanos en DSG y pacientes celíacos en DN vs sanos en DSG. Por tanto, se observan diferencias significativas entre sanos y celíacos independientemente de la ingesta de gluten en la dieta. Además, como habíamos visto previamente, también aparecen diferencias entre sanos en DN y sanos en DSG.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la actividad de la microbiota intestinal en pacientes celíacos es diferente a la de sanos. La tripsina, una vez que realiza su función en el duodeno, entra en el intestino grueso donde pierde parte de su actividad debido a la acción de proteasas de origen bacteriano (256). Además, en el tracto digestivo también aparecen bacterias con actividad proteolítica similar a la que presenta la tripsina. Por tanto, la ATF varía dependiendo de la actividad de las bacterias intestinales y permite estudiar de una manera indirecta la microbiota intestinal (249). Numerosos trabajos han descrito un desequilibrio en la composición microbiana intestinal de pacientes celíacos así como en los productos metabólicos generados por ésta (85-87, 165, 248). Dentro de los grupos de bacterias que aparecen frecuentemente alterados en pacientes celíacos están *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Bifidobacterium* (145). Precisamente, se han caracterizado bacterias incluidas dentro del género *Bacteroides* que podrían afectar a la ATF. En la actualidad se desconoce la identidad de todas las bacterias responsables de la inactivación de la tripsina humana en el intestino grueso, aunque se ha descrito que cepas de *Bacteroides distasonis* si tienen esta capacidad (256). Así mismo, algunos trabajos han mostrado la presencia en el tracto digestivo de cepas bacterianas del género *Bacteroides* con actividad trípica similar a la que encontramos en humanos (282). Por tanto, las alteraciones observadas en pacientes celíacos dentro del grupo de los *Bacteroides*, y de otros grupos bacterianos, podrían explicar el

incremento de la ATF en las muestras de pacientes con EC. Además, aunque la retirada del gluten de la dieta en pacientes celíacos puede recuperar en parte la microbiota intestinal, algunos grupos bacterianos como los *Bacteroides* permanecen alterados en celíacos tratados (86). Esto explicaría porque el incremento en la ATF permanece en pacientes celíacos tratados.

- **Actividad glutenásica fecal (AGF)**

La AGF es una intensa actividad proteolítica frente a las proteínas del gluten que se detecta por primera vez en esta Tesis Doctoral y está relacionada con el consumo del gluten en la dieta. En la Figura 2.1 se pueden observar los valores de mediana, rangos e intercuartiles de AGF obtenidos en este apartado. Los valores más altos y diversos de AGF se obtuvieron en los pacientes celíacos activos con un valor de mediana de 3612. Los pacientes celíacos tratados y los voluntarios sanos en DN presentaban resultados similares con una mediana de 2460 y 2750 respectivamente. Sin embargo, en el grupo de celíacos tratados varios valores fueron considerados como *outliers* (o valores fuera de la población). En cambio, los valores más bajos de AGF pertenecían a la población de sanos en DSG (mediana = 1014). El análisis estadístico de los cuatro grupos analizados dos a dos mediante el test U de Mann-Whitney mostraron que había diferencias estadísticamente significativas entre: celíacos en DN vs sanos en DSG y celíacos en DSG vs sanos en DSG. Sin embargo, al comparar sanos en DN vs celíacos en DN no se encontraron diferencias significativas. Esto parece mostrar que la AGF depende del consumo de gluten en la dieta, así como de la aparición de la EC.

En el Capítulo 1 de Resultados se expuso que la AGF parecía provenir del metabolismo microbiano intestinal. De este modo, el incremento en la AGF que se detecta en pacientes celíacos con respecto a voluntarios sanos podría deberse a una mayor actividad proteolítica de origen bacteriano en el intestino de celíacos. Precisamente, Bernardo D *et al* (142) mostraron un patrón específico de proteasas de origen bacteriano, con la capacidad de hidrolizar gliadinas, en la mucosa duodenal de pacientes celíacos, las cuales no aparecían en la mucosa de controles no celíacos. Estas proteasas podrían atravesar el intestino grueso y ser eliminadas por las heces donde podrían formar parte de la AGF que detectamos en este Capítulo. Sin embargo, se desconocen las bacterias capaces de generar estas gliadinasas y los productos que se forman tras su actividad proteolítica. Numerosos trabajos han mostrado que los pacientes celíacos presentan una disbiosis intestinal que podría participar en el

proceso patológico de la EC (85-87, 165, 248). Los grupos bacterianos que aparecen frecuentemente alterados en pacientes celíacos son *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Bifidobacterium* (145). Dentro de estos grupos aparecen especies bacterianas con actividad proteolítica que podrían ser los responsables de que se genere una actividad glutenásica mayor en pacientes celíacos que en voluntarios sanos. Por ejemplo, se han aislado de heces humanas varias cepas bacterianas pertenecientes a *Bifidobacterium*, tales como *B. longum* IATA-ES1, *B. animalis* IATA-A2 y *B. bifidum* IATA-ES2, capaces de hidrolizar péptidos de gluten. Además, se han descrito cepas bacterianas intestinales de *Bacteroides fragilis* que son capaces de degradar gliadina (145, 146, 237). Aunque no se ha establecido una relación entre la disbiosis intestinal y las bacterias proteolíticas, el incremento en la AGF que se observa en pacientes celíacos podría ser debido a un desequilibrio en las bacterias intestinales con la capacidad de hidrolizar gluten.

A pesar del incremento de AGF que aparece en celíacos activos, no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a sanos en DN. Esto puede ser debido a que, como vimos anteriormente, la AGF es muy dependiente del consumo de gluten en la dieta. Tal y como muestran nuestros resultados, en pacientes celíacos tratados se produce un descenso de esta actividad con respecto a celíacos activos, demostrando que el consumo de gluten influye en la AGF de pacientes celíacos. Por el contrario, si aparecen diferencias significativas entre celíacos tratados y sanos en DSG. La retirada de gluten de la dieta sólo es capaz de restaurar en parte la microbiota intestinal de pacientes celíacos (89), de modo que la parte que se mantiene alterada puede estar generando la mayor actividad glutenásica que detectamos en celíacos tratados. Precisamente, *Bacteroides*, dónde se han descrito cepas bacterianas capaces de degradar gliadina, es un género que permanece alterado en pacientes celíacos tratados (237). Además, las proteasas bacterianas descritas en el trabajo de Bernardo D *et al.* (142) también aparecían en pacientes celíacos tratados. Por tanto, el incremento en la AGF que se observa en pacientes celíacos parece que es debido a un desequilibrio en la microbiota proteolítica de estos pacientes.

- ***Actividad prolilendopeptidásica fecal y dipeptidil peptidásica IV fecal (PEPF y DPPIVF)***

La PEP y la DPPIV son actividades proteolíticas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos en los que participan residuos de prolina. En este apartado se analizaron

ambas actividades enzimáticas en voluntarios sanos y pacientes celíacos en DN y DSG. Los resultados de mediana rangos e intercuartiles están representados en la Figura 2.1. Mediante el test U de Mann-Whitney para valores no paramétricos se analizaron las posibles variaciones existentes entre los grupos poblacionales por pares. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para estas dos actividades enzimáticas entre ninguno de los grupos.

En el Capítulo 1 de Resultados se detectó actividad DPPIVF y actividad PEPF en las muestras de heces de voluntarios sanos. Curiosamente la actividad PEP no aparece en las enzimas digestivas humanas que actúan en el intestino delgado y, como consecuencia de ello, el gluten sufre una digestión parcial. La actividad PEPF se incrementaba cuando los voluntarios sanos ingerían grandes cantidades de gluten en la dieta, probablemente por la actividad proteolítica de la microbiota intestinal. Por tanto, esta actividad podría participar en el metabolismo del gluten. En este apartado también se detectaron las actividades PEPF y DPPIVF en las muestras fecales de pacientes celíacos. Sin embargo, no se observaron diferencias entre pacientes celíacos activos y pacientes celíacos tratados. Esto indica que estas actividades no se ven muy influenciadas por la ingesta de gluten en pacientes con EC. Además, al comparar los resultados de PEPF y DPPIVF entre sanos y celíacos no se manifestaron diferencias estadísticamente significativas en función del diagnóstico. Por tanto, no aparece un desequilibrio en estas actividades enzimáticas capaces de hidrolizar péptidos con prolina en el intestino de pacientes celíacos.

2.2- Los ácidos grasos de cadena corta son significativamente más abundantes en pacientes con enfermedad celíaca

Los AGCC son los principales aniones que surgen de la fermentación bacteriana en el colon. Las diferencias que aparecen en la microbiota intestinal de pacientes celíacos se podrían detectar indirectamente cuantificando los AGCC excretados en las heces (217). Se analizaron los AGCC en las muestras fecales correspondientes a 16 voluntarios sanos en DN, 11 individuos sanos en DSG, 22 enfermos celíacos activos y 18 pacientes celíacos en DSG. Los resultados obtenidos para cada AGCC están representados en la Tabla 2.1. Se puede observar que el AGCC mayoritario es el ácido acético seguido por el ácido propiónico y el ácido butírico. En cambio, los ácidos grasos que poseen una cadena más larga y los AGCC ramificados aparecen en concentraciones menores.

Tabla 2. 1: Valores medios de las concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en las muestras fecales de 16 sanos en DN, 11 sanos en DSG, 22 celíacos en DN y 18 celíacos en DSG. DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten

<i>Tipo de AGCC</i>	<i>Sano DN</i>	<i>Sano DSG</i>	<i>Celiaco DN</i>	<i>Celiaco DSG</i>
Ácido Acético*	26,76±12,23	20,60±10,46	42,68±19,97**	50,96±22,02**
Ácido Propiónico*	7,24±2,95	5,82±2,27	10,92±5,46**	14,78±9,80**
Ácido Isobutírico*	0,95±0,34	0,90±0,49	1,31±0,65	0,93±0,43
Ácido Butírico*	5,19±3,11	4,22±2,15	8,77±5,78**	9,95±5,54**
Ácido Isovalérico *	1,37±0,60	1,18±0,55	1,77±1,01**	1,18±0,60
Ácido Valérico*	0,90±0,41	0,77±0,42	1,42±0,87**	1,28±0,62
Ácido Hexanoico*	0,35±0,31	0,36±0,33	0,49±0,50	0,50±0,48
Totales*	42,85±14,75	33,94±14,95	67,52±28,81**	79,74±34,37**

* Media de las muestras (mmol/Kg heces)

** Diferencias significativas con respecto a sanos en DN y sanos en DSG: p <0,05

Se analizó mediante el test H de Kruskal-Wallis para valores no paramétricos si aparecían diferencias en la concentración de los AGCC en función del diagnóstico. Los resultados mostraron que existía un desequilibrio estadísticamente significativas en la concentración del ácido acético, propiónico, butírico, isovalérico, valérico y los AGCC totales. Los pacientes celíacos, independientemente de la dieta, mostraban una concentración mayor de AGCC que los individuos sanos. Se llevó un análisis estadístico con el test U de Mann-Whitney para valores no paramétricos entre los grupos poblacionales por pares. Los resultados mostraron que había diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones del ácido acético, propiónico, butírico y los AGCC totales entre: celíacos en DN vs sanos en DN, celíacos en DSG vs sanos en DSG, celíacos en DN vs sanos en DSG y celíacos en DSG vs sanos en DN. Por tanto, existen diferencias en la concentración de los AGCC en función del diagnóstico. Además, aparecía un desequilibrio en el ácido isovalérico y el ácido valérico entre los celíacos en DN y los sanos, independientemente de la dieta. Los resultados de AGCC totales se pueden observar de una manera más gráfica en la Figura 2.2 donde están representados los valores de mediana, rangos e intercuartiles de los AGCC totales cuantificados en las muestras fecales de sanos en DN, sanos en

DSG, celiacos activos y celiacos en DSG. Se puede ver que los valores más altos de AGCC totales aparecen en los celiacos y los más bajos aparecen en los sanos.

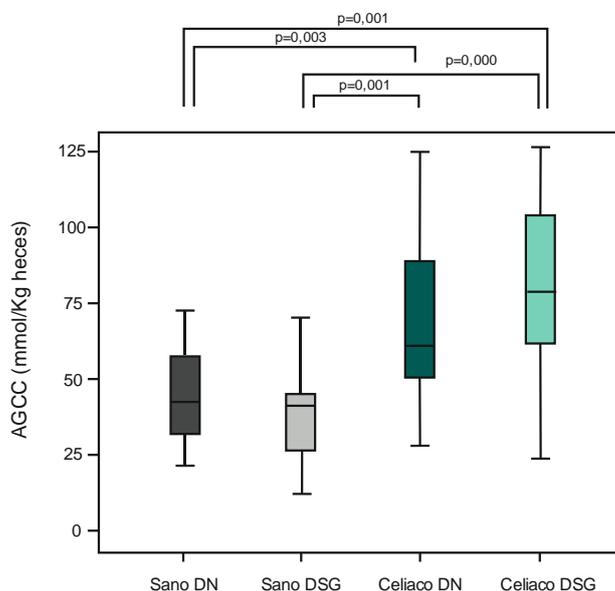


Figura 2. 2: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de la concentración de AGCC en las muestras fecales de sanos en DN, sanos en DSG, celiacos DN y celiacos en DSG. AGCC: ácidos grasos de cadena corta, DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten.

Todos los alimentos que no se digieren completamente en el intestino delgado llegan al intestino grueso donde se convierten en sustrato para el crecimiento de las bacterias intestinales. Los AGCC son los principales productos que se generan tras la fermentación bacteriana en el colon. Por tanto, el incremento en los AGCC que se observa en las muestras fecales de pacientes celiacos puede deberse a la disbiosis intestinal que aparece en estos pacientes. Numerosos trabajos han descrito un desequilibrio en la microbiota intestinal en los pacientes celiacos con respecto a la microbiota intestinal de los sanos (85-87, 165, 248). Además, en un estudio realizado por Tjellström B *et al.* (165), se detectó un desequilibrio entre la concentración de los AGCC fecales de niños celiacos y de niños sanos, que fue asociada a una diferente actividad metabólica microbiana en el intestino de los pacientes celiacos. En este apartado se cuantificaron los AGCC en muestras fecales de adultos y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el trabajo de Tjellström B *et al.*, también se observó una mayor producción de AGCC en el intestino de pacientes celiacos. Por

tanto, este estudio parece demostrar la presencia de una actividad metabólica microbiana diferente entre sanos y celíacos. Sin embargo, la microbiota intestinal no es el único factor importante en la producción de los AGCC.

La concentración fecal de los AGCC viene determinada por un complejo conjunto de factores como pueden ser la dieta seguida por el individuo, la microbiota intestinal o un fallo metabólico derivado de la enfermedad (216). Entre los metabolitos que aparecieron alterados en niños celíacos estaban los AGCC ramificados (165). Además, en este apartado también se mostraron diferencias significativas para el ácido isovalérico entre adultos celíacos en DN y adultos sanos. Aunque los principales precursores de los AGCC son principalmente carbohidratos, los precursores exclusivos de los AGCC ramificados son las proteínas, de modo que los AGCC ramificados son buenos marcadores para estudiar el metabolismo de proteínas en el intestino. Por tanto, el incremento en los AGCC ramificados en pacientes celíacos puede indicar un fallo en el metabolismo de proteínas en estos pacientes. Además, los AGCC principales también se pueden generar de la fermentación bacteriana de componentes proteicos (289, 290). De hecho, en el Capítulo 1 se describió que la sobrecarga de gluten en la dieta era capaz de incrementar la mayoría de los AGCC. Por tanto, es posible que los pacientes celíacos presenten alterado el metabolismo de proteínas en el intestino delgado, llegando una mayor cantidad de proteína al intestino grueso. Estos componentes podrían ser fermentados por las bacterias colónicas generando una cantidad anómala de AGCC en pacientes celíacos. Precisamente, ya han sido descritos fallos en la digestión de las proteínas del gluten en el duodeno de pacientes celíacos (158). Por tanto, el incremento de los AGCC en pacientes celíacos podría producirse como consecuencia de la disbiosis intestinal documentada en la EC o debido a un fallo en el metabolismo intestinal de las proteínas en estos pacientes.

2.3- El contenido de gluten es menor en las heces de pacientes celíacos que en las heces de los voluntarios sanos

Parte del gluten consumido en la dieta recorre todo el tracto digestivo, eliminándose por las heces. En este apartado se cuantificó la cantidad de gluten que se excreta por las heces en voluntarios sanos y pacientes celíacos para estudiar si aparecían diferencias a nivel de diagnóstico. Los valores de medianas, rangos e intercuartiles correspondientes a la concentración de gluten fecal en las muestras de 14 voluntarios sanos en DN, 11 sanos en DSG, 18 celíacos activos y 15 celíacos en DSG están representados en la Figura 2.3. En la Figura se puede observar que los

valores más bajos en la concentración de gluten fecal aparecen en pacientes celíacos que llevaban más de un año en DSG y en los voluntarios sanos que estuvieron una semana en DSG. Sin embargo, los celíacos en DSG presentaron una cantidad significativamente menor de gluten fecal que los sanos en DSG. En los voluntarios sanos y pacientes celíacos en DN la detección de gluten en heces es más alta y variable que la cantidad cuantificada en individuos bajo una DSG, independientemente del diagnóstico, de modo que se encontraban diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos que ingerían gluten en la dieta con respecto a los voluntarios sanos en DSG y pacientes celíacos tratados. Además, se detectaron valores estadísticamente más altos en sanos en DN con respecto a celíacos activos. Esto parece indicar que hay diferencias en la excreción de gluten fecal en función del diagnóstico.

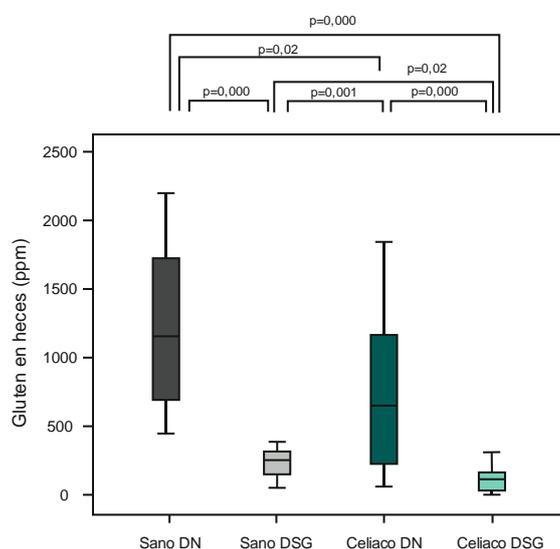


Figura 2. 3: Valores de mediana, rangos e intercuartiles del gluten fecal cuantificado en las muestras de sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN y celíacos en DSG. DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten.

Los resultados obtenidos en este apartado muestran que el gluten presente en las heces es dependiente de la dieta. Los valores más bajos de gluten fecal se detectaron en aquellos individuos que llevaban a cabo una DSG. De modo que, como vimos anteriormente, existe una relación entre el consumo de gluten en la dieta y la cantidad de éste que se excreta por las heces. Además, también se encontraron diferencias a nivel de diagnóstico. Los pacientes celíacos activos presentaban menos gluten en la dieta que los voluntarios sanos en DN. Sin embargo, a ninguno de estos dos grupos se les controló la ingesta de gluten en la dieta y estos resultados pueden

ser debidos a un menor consumo de gluten por parte de los celíacos. Aunque los pacientes activos seleccionados desconocían que padecían de EC en el momento de la recogida de muestra, ya que la enfermedad no había sido confirmada por la biopsia duodenal, es posible que fueran informados de la sospecha clínica por parte del personal sanitario. No obstante, las recomendaciones diagnósticas para este tipo de pacientes es que se mantengan en DN hasta la extracción de la biopsia con la finalidad de detectar la arquitectura duodenal patológica asociada a la EC. También, es posible que los pacientes celíacos hubiesen notado un perjuicio cuando ingerían determinados alimentos ricos en gluten y que los hubieran eliminado de su consumo habitual. Por tanto, parece factible la hipótesis de un menor consumo de gluten por parte de los pacientes celíacos. Sin embargo, la ingesta de gluten no es el único factor a tener en cuenta. Es posible que otros factores, como la presencia de una mayor actividad proteolítica frente al gluten en pacientes celíacos, también tengan un papel importante. Se ha descrito que los pacientes celíacos presentan una actividad glutenásica elevada. Además, como veremos más adelante, las muestras fecales de pacientes celíacos activos muestran una mayor actividad frente al péptido 33-mer. El anticuerpo utilizado para la detección de gluten en las heces detecta una región de este péptido inmunogénico (280). Por tanto, parece posible la rotura del epítipo del 33-mer que reconoce el anticuerpo G-12 mediante la acción de las peptidasas fecales que aparecen en pacientes celíacos. Como consecuencia, se detectaría menos gluten fecal en pacientes celíacos. En conclusión, hay varios motivos para explicar este descenso de gluten en las muestras fecales de celíacos activos y es posible que se deba al conjunto de todos ellos.

A pesar de que los voluntarios en DSG no consumían nada de gluten, en todas las muestras se detectaba una señal por parte del kit ELISA que se consideró como el fondo o *background* de la técnica. Esta señal podría no deberse a la presencia de gluten en la dieta, sino a la interferencia del kit con otros componentes de las heces. Curiosamente, los pacientes celíacos tratados presentaban una señal menor a la que mostraban los voluntarios sanos en DSG. Esto puede ser debido al corto período de tiempo que los sanos mantuvieron la DSG (1 semana), que pudo no ser suficiente para eliminar completamente las trazas de gluten del intestino. Las características físicoquímicas del gluten, como la insolubilidad al agua o la formación de una masa pegajosa, pueden permitir que una cantidad residual de gluten permanezca en el intestino y que se vaya eliminando poco a poco a lo largo de la semana. Además, es posible que el aumento de la señal en voluntarios sanos en DSG con respecto a celíacos tratados también se deba a la ingestión inadvertida de pequeñas cantidades

de gluten. No obstante, los voluntarios sanos fueron informados de los alimentos que contenían gluten, fueron instruidos para seguir una correcta DSG y tras la dieta proporcionaron un diario en el que se mostraba en detalle los alimentos consumidos durante la semana en DSG para detectar posibles transgresiones dietéticas. No se detectó infracción de ningún tipo en los 11 voluntarios analizados, por lo que parece poco probable que la ingestión inadvertida de gluten sea la explicación a la mayor señal del kit ELISA en voluntarios sanos en DSG.

2.4- Los sobrenadantes fecales de los pacientes celíacos también son capaces de hidrolizar el péptido 33-mer

En el Capítulo 1 de la Tesis se mostró que los sobrenadantes de algunas muestras fecales de voluntarios sanos tenían la capacidad de hidrolizar el péptido 33-mer. En este apartado se analizó mediante HPLC la actividad peptidásica frente al 33-mer en muestras fecales de pacientes celíacos y de voluntarios sanos. Para ello se incubaron con el péptido 33-mer las muestras fecales de 15 voluntarios sanos en DN, 11 voluntarios sanos en DSG, 13 pacientes celíacos en DN y 20 pacientes celíacos en DSG a distintos tiempos ($t=2h$, $t=6h$, $t=8h$ y $t=12h$). En la figura 2.4 A se representan los tiempos que fueron necesarios para que las muestras fecales hidrolizaran completamente el péptido 33-mer en función del diagnóstico. Se consideró que el péptido estaba hidrolizado cuando se reducía el área del pico al menos un 90%. En la figura 2.4 A se observa que un 39,5% de las muestras fecales, independientemente del diagnóstico, no eran capaces de hidrolizar completamente el péptido 33-mer. También se observa que las muestras de heces de sanos tienen menos capacidad para digerir el 33-mer que las muestras de los pacientes celíacos. Sólo un 46,6% de las muestras fecales de sanos en DN hidrolizaron el 33-mer completamente frente al 62,5% de las muestras de celíacos. Además, las muestras fecales de pacientes celíacos digieren el 33-mer antes que las muestras de voluntarios sanos. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en función del diagnóstico.

Por otro lado, en el Capítulo 1, aunque no se encontró ninguna relación significativa entre las actividades proteolíticas fecales y la actividad de las heces para hidrolizar el péptido 33-mer, si se observó que los sobrenadantes fecales con mayor AGF eran capaces de hidrolizar este péptido en menos tiempo. En la figura 2.5 B se muestra una gráfica que correlaciona la hidrólisis del 33-mer en el tiempo con respecto a los valores de AGF obtenidos en sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN y

celiacos en DSG. En esta Figura se puede observar que la mayoría de las muestras que presentan una AGF elevada son capaces de hidrolizar el péptido 33-mer en menos tiempo, independientemente del diagnóstico y de la dieta (salvo excepciones). Sin embargo, no existe relación significativa entre estas dos actividades proteolíticas.

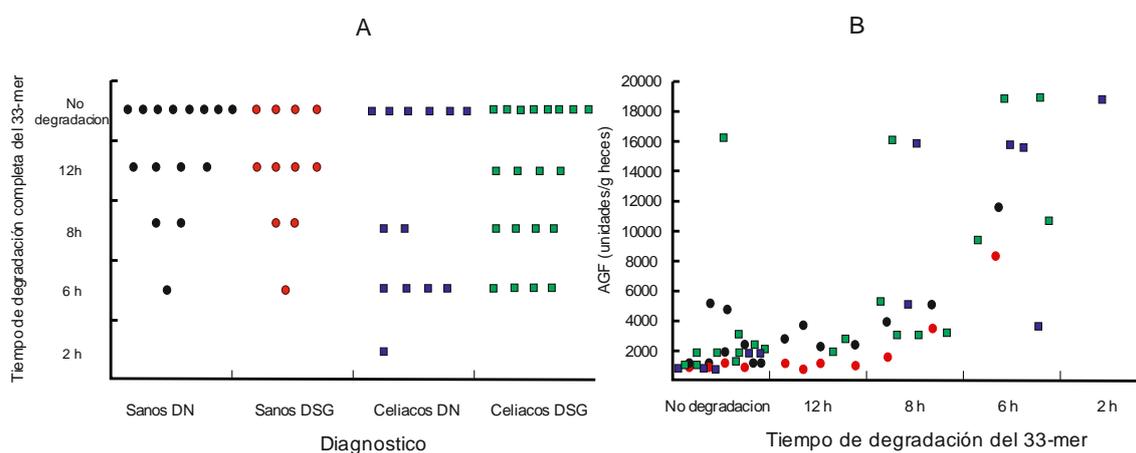


Figura 2. 4: A, Esquema en el que está representado el tiempo necesario para la degradación del 33-mer por parte de las heces de sanos en DN, sanos en DSG, celiaicos en DN y celiaicos en DSG B, Correlación entre los valores obtenidos de AGF con la actividad degradadora de 33-mer con respecto al tiempo en sanos en DN, sanos en DSG, celiaicos en DN y celiaicos en DSG. Los puntos negros corresponden a los valores obtenidos en sanos en DN, los puntos rojos a la DSG de sanos, los recuadros azules a celiaicos activos y los verdes a celiaicos en DSG. DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten.

Las proteasas digestivas humanas presentes en el tracto intestinal no son capaces de hidrolizar el péptido 33-mer (25), por lo que la actividad peptidásica frente al 33-mer que detectamos en las heces parece provenir de la actividad metabólica microbiana en el intestino grueso. Numerosos trabajos muestran un desequilibrio en la microbiota intestinal entre sanos y celiaicos (85, 89). Incluso se ha descrito un patrón de proteasas bacterianas degradadoras de gliadina presente en la mucosa duodenal de pacientes celiaicos que no aparece la mucosa de los controles no celiaicos (142), de modo que la actividad proteolítica de la microbiota intestinal podría generar una actividad hidrolítica frente al 33-mer diferente en sanos y celiaicos. Sin embargo, en este apartado no aparecen diferencias estadísticamente significativas en función del diagnóstico. Esto puede ser debido a que el tamaño muestral analizado es muy pequeño. Anteriormente habíamos demostrado que las muestras fecales de pacientes celiaicos presentan una mayor AGF que las muestras de sanos. Aunque no hay una

correlación significativa entre la AGF y la capacidad hidrolítica de las heces frente al 33-mer, se ha observado una tendencia a que las muestras fecales con mayor AGF digieran el péptido 33-mer en menos tiempo. Esto parece indicar que las dos actividades proteolíticas, a pesar de ser diferentes, pueden estar relacionadas. El incremento de la AGF en las muestras de pacientes celíacos se explicó como una mayor actividad proteolítica frente al gluten de origen microbiano, debido a la disbiosis intestinal que aparece en estos pacientes. Sin embargo, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la actividad peptidásica fecal frente al 33-mer en función del diagnóstico parece indicar que no hay una microbiota característica capaz de llevar a cabo esta actividad en pacientes celíacos.

2.5- Discusión general

La EC es un desorden multisistémico cuya etiología es multifactorial y en parte desconocida (27). El gluten es el principal desencadenante de la enfermedad, de modo que la simple presencia o eliminación del gluten de la dieta puede activar o detener el proceso patológico (4). Sin embargo, para desarrollar la EC también es necesario una predisposición genética del individuo, así como la implicación de otros factores ambientales desconocidos (31). Pese a que el gluten es el principal desencadenante de la enteropatía, no hay muchos estudios sobre el metabolismo *in vivo* de las proteínas del gluten en pacientes celíacos. Estudios previos han mostrado que los pacientes celíacos activos podrían presentar un metabolismo del gluten alterado asociado a un desequilibrio en la actividad de proteasas intestinales o a un incremento de la permeabilidad intestinal (151, 158). Sin embargo, no se ha estudiado el posible papel de la microbiota intestinal en el metabolismo del gluten en pacientes celíacos. Por esta razón, en el Capítulo 2 de la Tesis se ha llevado un estudio comparativo entre la actividad metabólica microbiana frente al gluten en voluntarios sanos y pacientes celíacos.

Los componentes proteicos ingeridos por el individuo sufren un proceso de digestión en el tracto gastrointestinal con el objetivo de generar nutrientes fácilmente asimilables por el hospedador (22). Sin embargo, las proteínas del gluten son resistentes a la digestión completa por las enzimas digestivas humanas debido a que presentan en su secuencia aminoacídica regiones ricas en glutamina y prolina (25). Aunque hoy en día se considera que la digestión parcial del gluten se produce en todos los individuos, durante mucho tiempo se pensó que la EC se debía a una digestión anómala del gluten causada por una deficiencia enzimática en el borde del

cepillo intestinal de los pacientes celíacos. Esta teoría se conoce como “hipótesis de la peptidasa perdida” o “hipótesis metabólica”. Como consecuencia de esta deficiencia enzimática, se generaría una degradación incompleta del gluten que facilitaría su efecto tóxico en los pacientes celíacos. Hay muchos trabajos en los que se detecta un descenso en la actividad peptidásica de las enzimas del cepillo intestinal y que apoyan esta teoría (155, 158, 164). Sin embargo, la hipótesis metabólica hoy en día está en desuso. Se ha demostrado que las proteasas digestivas humanas hidrolizan parcialmente el gluten en todos los individuos, independientemente de la EC, generándose péptidos de gran tamaño capaces de desencadenar la respuesta inmunológica en pacientes susceptibles de padecer la EC (25).

Todos los componentes de la dieta que escapan a la digestión de las enzimas digestivas humanas son sustratos potenciales para las bacterias en el lumen intestinal. Sin embargo, con frecuencia se subestima el papel de la microbiota intestinal en la hidrólisis de las proteínas (122). El gran consumo de gluten en la dieta occidental y la resistencia de las prolaminas del gluten a las enzimas digestivas humanas, hace que aparezcan péptidos del gluten de gran tamaño en el lumen duodenal que pueden ser aprovechados por las bacterias. Bernardo D *et al.* (142) mostraron un patrón específico de proteasas de origen bacteriano, con la capacidad de hidrolizar gliadinas, en la mucosa duodenal de pacientes celíacos, que no aparecían en la mucosa de los controles no celíacos. Aunque se desconocen las bacterias que producen estas proteasas, y los péptidos que generan, es posible que se originen péptidos inmunogénicos que no estarían presentes en sanos. Además, numerosos estudios han mostrado un desequilibrio entre la microbiota intestinal de sanos y celíacos, así como en los metabolitos derivados de la actividad metabólica microbiana, llegándose a hipotetizar que la disbiosis intestinal presente en pacientes celíacos podría ayudar a que se desencadene el proceso patológico de la enfermedad. Entre los grupos bacterianos que aparecen alterados frecuentemente en pacientes celíacos están *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Staphylococcus* y *Escherichia* (86, 89, 165, 252). Precisamente, se han descrito cepas de *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, aisladas de las heces de humanos, capaces de hidrolizar péptidos del gluten. Por tanto, aunque no hay estudios directamente con bacterias proteolíticas duodenales, es posible que la disbiosis intestinal en pacientes celíacos genere una degradación de las proteínas del gluten diferente a la que se produce en sanos. Los resultados que se obtuvieron en el Capítulo 2 muestran una mayor actividad proteolítica en las heces de pacientes celíacos con respecto a voluntarios sanos. Se observó que los pacientes celíacos presentaban un incremento en la ATF y en la AGF

con respecto a los sanos. Esto parece indicar que los pacientes celíacos presentan una microbiota proteolítica diferente a la de voluntarios sanos que podría generar un metabolismo del gluten anormal.

Los péptidos y proteínas que escapan a la digestión en el intestino delgado llegan al intestino grueso donde hay una microbiota compleja. Las proteínas del gluten presentan regiones ricas en prolina que le confieren resistencia frente a las proteasas digestivas humanas, de modo que péptidos del gluten de gran tamaño llegan al intestino grueso (143). El intestino grueso se caracteriza por presentar una microbiota diversa que es responsable de la conversión de muchas sustancias no asimilables a nutrientes. La diversidad genética de la microbiota intestinal produce multitud de enzimas y rutas bioquímicas que son distintas a las que se encuentran en el hospedador (213, 214). Por tanto, es factible que la AGF y la ATF que se cuantificó en este Capítulo proceda de la actividad proteolítica microbiana del intestino grueso. Aunque el incremento de la ATF y de la AGF en pacientes con EC puede ser explicada por la disbiosis intestinal que aparece en estos pacientes, las actividades también pueden indicar un fallo en el metabolismo de proteínas en los pacientes con EC. Un fallo en la hidrólisis de proteínas en el intestino delgado de los pacientes celíacos podría permitir una mayor llegada de proteínas al intestino grueso capaz de estimular la producción de proteasas de origen microbiano.

Como consecuencia del metabolismo bacteriano de componentes de origen proteico en el colon se generan AGCC y otros compuestos nitrogenados. En este apartado se describe un incremento en la concentración de los AGCC en las muestras fecales de adultos celíacos con respecto a voluntarios sanos. Además, un estudio similar realizado por Tjellström B *et al.* (165), también mostró un desequilibrio entre los AGCC fecales de niños celíacos y niños sanos. Este desequilibrio fue asociado a una diferente actividad metabólica microbiana en el intestino de los pacientes celíacos a consecuencia de la disbiosis intestinal presente en estos individuos. Sin embargo, ¿podría el incremento de AGCC deberse a un fallo en el metabolismo de proteínas en pacientes celíacos? Entre los AGCC alterados en pacientes con EC están los AGCC ramificados cuyos precursores exclusivos son los componentes proteicos. Además, en el Capítulo 1 se vio que la sobrecarga de gluten en la dieta permite una mayor llegada de las proteínas del gluten al intestino grueso donde son metabolizadas por las bacterianas colónicas produciéndose un incremento en los AGCC. Por tanto, es posible que en pacientes celíacos exista un fallo en el metabolismo duodenal de proteínas que permite una mayor llegada de componentes proteicos al colon. Estos componentes proteicos podrían ser fermentados por las bacterias colónicas

generándose una mayor cantidad de AGCC en el intestino de pacientes celíacos. Además, hay trabajos que sugieren que la digestión de las proteínas del gluten en el duodeno de pacientes celíacos es diferente al de sanos. Se ha descrito una deficiencia enzimática en las peptidasas del cepillo intestinal de pacientes celíacos, así como un patrón de proteasas bacterianas capaces de hidrolizar gliadinas en pacientes celíacos pero no en controles no celíacos (142, 158). Sin embargo, más estudios son necesarios para dilucidar si el desequilibrio en los AGCC en las heces de pacientes celíacos se debe únicamente a la disbiosis intestinal o también aparece alterado el metabolismo de proteínas en el intestino de pacientes celíacos.

Una parte del gluten ingerido en la dieta es capaz de atravesar el tracto digestivo, sin ser aprovechado por el hospedador ni por las bacterias intestinales, excretándose por las heces. En el Capítulo 1 se observó que la cantidad de gluten ingerido en la dieta era proporcional al que se eliminaba en las heces. En este apartado se detectó que las muestras fecales de pacientes celíacos presentaban menos gluten que las muestras fecales de los voluntarios sanos. Este descenso en el gluten eliminado por las heces en pacientes celíacos podría deberse a un conjunto de factores como pueden ser una reducción en el consumo de gluten por el paciente, un incremento en la permeabilidad intestinal y/o un aumento en la actividad proteolítica intestinal frente al gluten. En la EC, como en la mayoría de las enfermedades digestivas, aparece una permeabilidad intestinal alterada que puede permitir el paso de los péptidos del gluten través del epitelio intestinal (154). Además, en este trabajo se ha descrito que los pacientes celíacos presentan una mayor actividad proteolítica intestinal frente al gluten que los voluntarios sanos. Como consecuencia, la excreción de gluten en los pacientes celíacos puede ser inferior a la excretada por los voluntarios sanos.

En definitiva, las diferencias entre sanos y celíacos observadas en este Capítulo, basadas en un incremento de las proteasas intestinales, una mayor presencia de AGCC fecales y una menor excreción del gluten en las heces, parecen indicar que el metabolismo del gluten en pacientes celíacos es diferente al de los voluntarios sanos.

3. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL GLUTEN EN FAMILIARES DE CELIACOS

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía con un alto componente genético. Dentro de los factores genéticos está ampliamente demostrado que la región HLA se encuentra implicada en la enfermedad (28). En la mayoría de las poblaciones de celiacos estudiadas, más del 90-95% de los pacientes expresan el heterodímero HLA-DQ2 y el otro 5-10% restante de pacientes celiacos son HLA-DQ8 (66). Sin embargo, estos alelos se encuentran en un 30-40% de la población mundial, de los cuales se estima que tan solo un pequeño porcentaje sufre la enteropatía. Por tanto, la presencia de estas proteínas HLA es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la EC (28). El objetivo de este apartado fue el estudio de la actividad metabólica microbiana asociada al consumo de gluten en familiares con un HLA-DQ susceptible a la EC (familiares DQ+) y familiares de celiacos sin susceptibilidad genética (familiares DQ-). A partir de estos resultados se realizó un estudio comparativo del metabolismo del gluten entre sanos, celiacos y los dos grupos de familiares analizados. Para llevar a cabo este objetivo se seleccionaron 58 familiares DQ+ (rango 25-59 años y media 37,6 años) y 13 familiares DQ- (rango 24-53 años y media 34,4 años) a los cuales se les recogieron muestras de heces en su dieta normal (DN), tras un mes llevando a cabo una dieta totalmente libre de gluten (DSG) y después de otro mes en el que se incorporaba de forma exógena 15 g de gluten al día a la DN (DN+15 g gluten/día). En la Figura 3.1 se muestra un esquema de las dietas llevadas a cabo por los familiares de pacientes celiacos. En las muestras fecales obtenidas al final de cada dieta se analizaron los siguientes parámetros:

- Actividades triptica fecal (ATF), glutenásica fecal (AGF), prolilendopeptidásica fecal (PEPF) y dipeptidil peptidásica IV fecal (DPPIVF).
- Cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) excretados en las heces.
- Cuantificación del gluten eliminado por las heces.
- Estabilidad del péptido 33-mer en los sobrenadantes fecales.

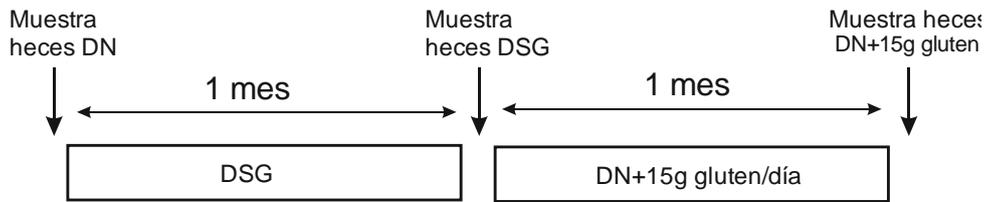


Figura 3. 1: Esquema de la dieta llevada a cabo por los familiares de pacientes celíacos durante 2 meses. El estudio consistió en un mes en dieta sin gluten (DSG), seguida de otro mes en dieta normal en la que se ingerían, además del gluten presente en su dieta habitual, 15 g de gluten/día. Las muestras fecales se recogieron al final de cada dieta.

3.1- Sólo se detectan diferencias significativas en la actividad glutenásica fecal entre las distintas dietas llevadas a cabo por los familiares

En el Capítulo 1 de Resultados se observó que la ATF, la AGF y la actividad PEPF cuantificadas en los voluntarios sanos eran dependientes del consumo de gluten en la dieta. El objetivo de este apartado fue determinar si en familiares de pacientes celíacos también se incrementaban estas actividades tras la ingesta de gluten. Para ello, se cuantificó la ATF, la AGF, la actividad PEPF y la actividad DPPIVF en las muestras de heces correspondientes a 50 familiares DQ+ y 13 familiares DQ- siguiendo una DN, una DSG y una DN+15 g gluten/día. Los resultados obtenidos están representados en la Figura 3.2. En los dos grupos de familiares se observa un incremento de en las tres actividades cuando se ingería una sobrecarga de gluten en la dieta. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que sólo aparecían diferencias estadísticamente significativas en la AGF. Se encontraron diferencias significativas en familiares DQ+ entre: DN vs DSG, DN vs DN+15 g gluten/día y DSG vs DN+15 g gluten/día. Por otro lado, en familiares DQ- sólo se detectaron diferencias estadísticas entre DSG vs DN+15 g gluten/día.

En este apartado se estudió como afectaba el consumo de gluten a las actividades proteolíticas fecales en familiares de pacientes celíacos. Los familiares, a diferencia de los voluntarios sanos, no mostraron diferencias estadísticamente significativas para la ATF entre la DSG y la DN. Además, la AGF, la cual se demostró en sanos que es muy dependiente de la ingesta de gluten en la dieta, descendía significativamente cuando los familiares DQ+ llevaban a cabo la DSG, mientras que los familiares DQ- presentaban valores similares en DN y DSG. Todos los familiares que participaron en el estudio eran padres o hermanos de niños celíacos. Estudios

previos habían mostrado que los familiares de celíacos presentaban una ingesta de gluten similar a los sanos (7). Sin embargo, parece normal que los familiares de primer grado de niños celíacos consuman menos gluten en su DN, adaptándose a las condiciones dietéticas especiales del enfermo. Como se observa más adelante, la cuantificación del gluten fecal en DN es menor en los familiares de pacientes celíacos con respecto a los voluntarios sanos. Este resultado parece confirmar una menor ingesta de gluten en familiares de celíacos con respecto a sanos. Aunque estas diferencias no son significativas, parece que pueden ser suficientes para que la ATF no aparezca incrementada en DN.

La misma explicación se puede dar para la dieta con sobrecarga de gluten. A diferencia de los voluntarios sanos, a los cuales se les añadía a la DSG una sobrecarga de gluten de 30 g gluten/día, los familiares de pacientes celíacos seguían una DN en la que se introducía de forma exógena 15 g de gluten/día. Si consideramos que la DN de los familiares lleva un bajo contenido de gluten, la condición dietética de sobrecarga de gluten realizada en los familiares podría ser menor que la llevada a cabo en los voluntarios sanos. Por tanto, esto podría explicar porque la ATF y la actividad PEPF en las muestras fecales recogidas en familiares de pacientes celíacos tras la DN+15 g gluten/día no eran tan altas como las que se obtuvieron en las muestras de sanos tras la DSG+30 g gluten/día. Como consecuencia, no aparecen diferencias significativas entre la DN+15 g de gluten/día y el resto de condiciones dietéticas analizadas en familiares, para estas actividades fecales. Según esta explicación, parece que la ATF y la actividad PEPF en familiares de pacientes celíacos podrían depender de la ingesta de gluten en la dieta, como ocurría en los voluntarios sanos. Sin embargo, los familiares en DN consumen menos gluten que los sanos y por eso no aparecen diferencias significativas. En cambio, la aparición de diferencias estadísticamente significativas en la AGF entre DN vs DN+15 g gluten/día para familiares DQ+ y entre DSG vs DN+15g gluten/día para el conjunto de todos los familiares, parece mostrar que esta actividad es más dependiente del consumo de gluten en la dieta. De modo que pequeñas variaciones en el consumo de gluten en la dieta pueden afectar a la AGF. Por tanto, el consumo de gluten en la dieta afecta a la AGF, como ocurre en voluntarios sanos.

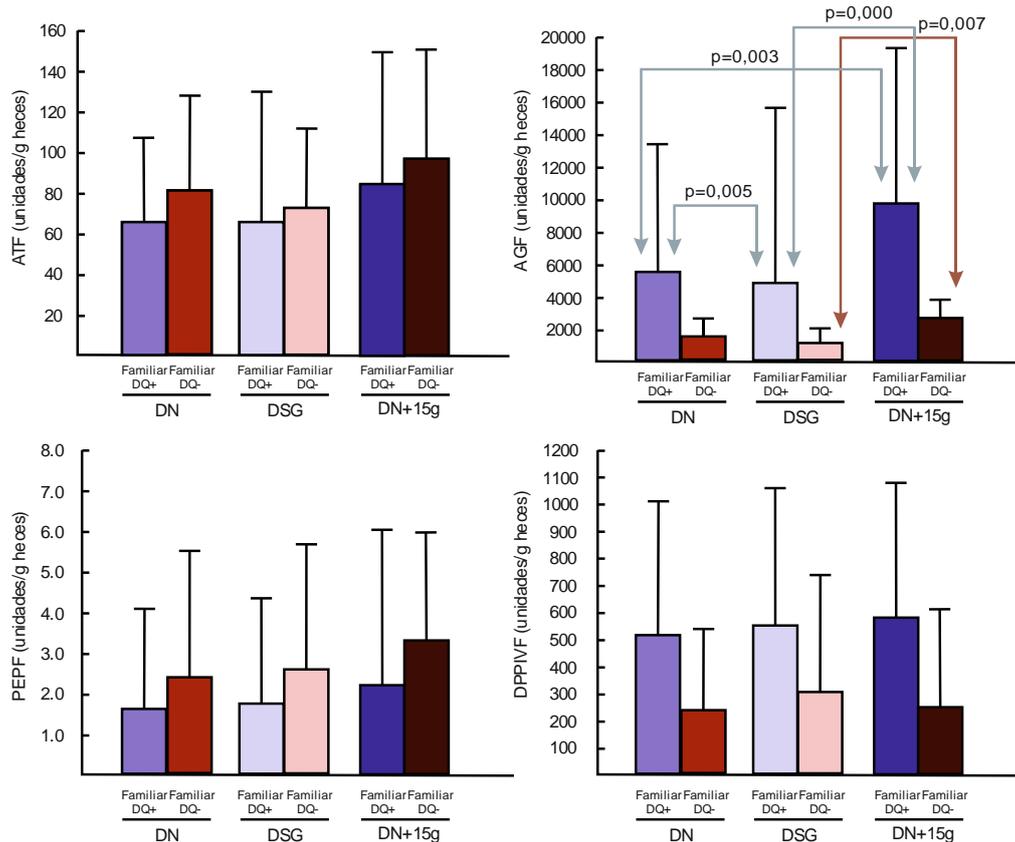


Figura 3. 2: Valores medios obtenidos de ATF, AGF, PEPF y DPPIVF en familiares DQ+ y familiares DQ- en DN, DSG y DN+15g gluten. DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten, DN+15 g gluten: DN con ingesta de 15 g de gluten al día, ATF: actividad trípica fecal, AGF: actividad glutenásica fecal, PEPF: actividad proil endopeptidásica fecal, DPPIVF: actividad dipeptidil peptidásica IV fecal.

3.2- Aparecen diferencias significativas entre familiares y enfermos celíacos en las actividades trípica fecal y glutenásica fecal

No todos los individuos que presentan una susceptibilidad genética y que ingieren gluten desencadenan el proceso patológico de la EC, por lo que se ha especulado que otros factores podrían participar en la aparición de la enteropatía. En los apartados anteriores se han descrito diferencias en la actividad enzimática de algunas proteasas fecales entre sanos y celíacos. El objetivo de este apartado fue realizar un estudio comparativo de las cuatro actividades enzimáticas fecales entre familiares de pacientes celíacos con respecto a voluntario sanos y pacientes celíacos. Para ello se cuantificó la ATF, la AGF, la actividad PEPF y la actividad DPPIVF en las muestras de heces correspondientes a 58 familiares DQ+ en DN, 13 familiares DQ- en DN, 16 voluntarios sanos en DN y 22 pacientes celíacos activos. Los resultados están representados en la Figura 3.3. Por otro lado, también se cuantificaron estas

actividades enzimáticas en 57 familiares DQ+ en DSG, 13 familiares DQ- en DSG, 11 voluntarios sanos en DSG y 18 pacientes celíacos tratados. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 3.4. El análisis estadístico reveló la existencia de diferencias significativas en la AGF y la ATF en función del diagnóstico. En la Figura 3.3 y en la Figura 3.4 se puede observar que los valores obtenidos de ATF en pacientes celíacos son superiores a los cuantificados en los otros grupos, independientemente de la dieta. Además, el análisis estadístico mostró que en DN había diferencias significativas entre celíacos activos vs sanos en DN y entre celíacos activos vs familiares DQ+ en DN. Los mismos resultados se obtuvieron para los valores de ATF obtenidos en DSG. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre celíacos y familiares DQ- probablemente por el pequeño tamaño muestral de estos últimos. Por otro lado, se compararon los pacientes celíacos con respecto a un grupo que englobaba a todos los pacientes no celíacos (sanos, familiares DQ+ y familiares DQ-). Los resultados mostraban diferencias altamente significativas tanto en DN como en DSG que implican que la población de celíacos tiene la ATF aumentada independientemente de la dieta.

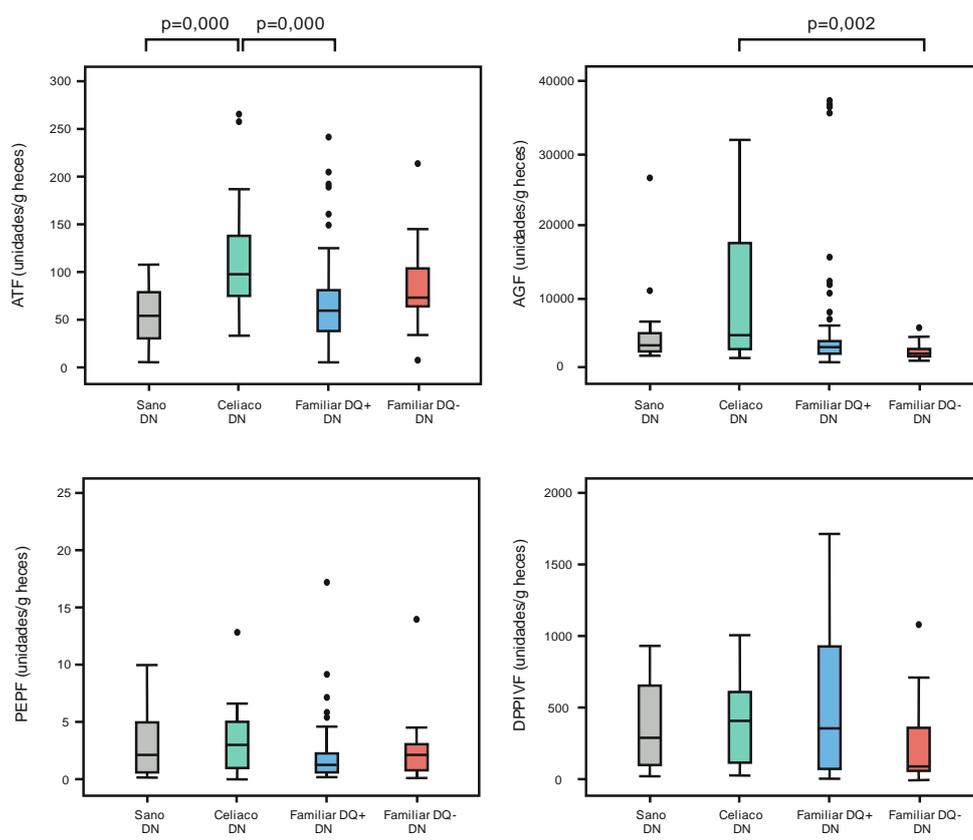


Figura 3. 3: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de las actividades enzimáticas analizadas en las muestras de sanos en DN, celíacos en DN, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN. ATF: actividad trípica fecal, AGF: actividad glutenásica fecal, PEPF: actividad proil endopeptidásica fecal, DPPIVF: actividad dipeptidil peptidásica IV fecal, DN: dieta normal.

La AGF también apareció aumentada en pacientes celíacos. Sin embargo, en DN sólo encontramos diferencias significativas entre celíacos vs familiares DQ-. Los celíacos en DSG presentan una menor AGF que los celíacos activos, pero al compararla con los valores obtenidos en el resto de grupos en DSG, se ve que también se encuentra incrementada en esas condiciones dietéticas. El análisis estadístico mostró que en DSG había diferencias significativas entre: celíacos vs sanos, celíacos vs familiares DQ+ y celíacos vs familiares DQ-. Por tanto, parece claro que la AGF se encuentra aumentada en pacientes celíacos. A diferencia de la AGF y la ATF, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las actividades PEPF y DPPIVF entre ninguno de los grupos.

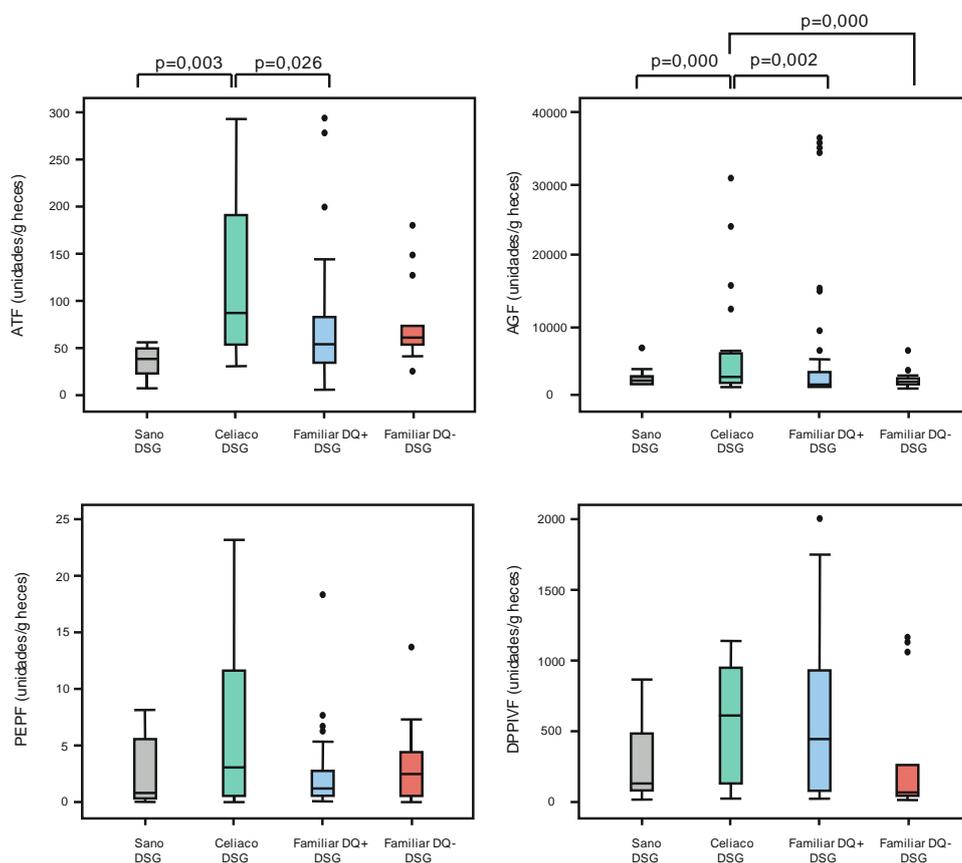


Figura 3. 4: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de las actividades enzimáticas analizadas en las muestras de sanos en DSG, celíacos en DSG, familiares DQ+ en DSG y familiares DQ- en DSG. ATF: actividad trípica fecal, AGF: actividad glutenásica fecal, PEPF: actividad proil endopeptidásica fecal, DPPIVF: actividad dipeptidil peptidásica IV fecal, DSG: dieta sin gluten.

En el Capítulo 2 de resultados se había mostrado que los pacientes celíacos presentaban un incremento en la AGF y en la ATF con respecto a voluntarios sanos. Se especuló que este incremento podía ser debido a la disbiosis intestinal que aparece en pacientes celíacos. Aunque no hay estudios directamente en familiares, varios trabajos han descrito que los pacientes celíacos presentan una microbiota intestinal diferente a la de sanos (86, 89, 165, 252). En este apartado se muestran diferencias estadísticamente significativas en la ATF y en la AGF entre los pacientes con EC y los familiares de enfermos celíacos. Por tanto, los familiares de pacientes celíacos podrían presentar una microbiota proteolítica similar a la de sanos y diferente a la de celíacos.

3.3- Los ácidos grasos de cadena corta aumentan con la ingesta de gluten en la dieta

En el Capítulo 1 de Resultados se observó que una sobrecarga de gluten en la dieta genera un incremento en la excreción de AGCC en las heces de los voluntarios sanos. El objetivo de este apartado fue determinar cómo afectaba la ingesta de gluten a la excreción de AGCC fecales en familiares de pacientes celíacos. Para ello, se cuantificaron los AGCC en las muestras fecales correspondientes a 50 familiares DQ+ y 13 familiares DQ- en DN, DSG y DN+15 g gluten/día. Los resultados obtenidos para cada AGCC están representados en la Tabla 3.1. Se puede observar que el AGCC mayoritario es el ácido acético seguido por el ácido propiónico y el ácido butírico. En cambio los ácidos grasos que poseen una cadena más larga y los AGCC ramificados aparecen en pequeñas concentraciones.

Tabla 3. 1: Valores medios de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en muestras fecales correspondientes a 50 familiares DQ+ y 13 familiares DQ- en las distintas dietas. DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten, DN+15 g: dieta normal con ingesta de 15 g de gluten al día.

AGCC	Familiar DQ+			Familiar DQ-		
	DN	DSG	DN+15 g	DN	DSG	DN+15 g
Acético*	48,22±26,11	51,68±27,62	54,27±27,50	49,42±24,42	37,76±24,90	56,11±20,63^b
Propiónico*	12,63±8,89	13,43±9,73	12,88±6,94	12,12±6,45	9,52±6,71	12,22±4,90
Isobutírico*	1,34±0,79	1,32±0,77	1,24±0,47	1,39±0,46	1,30±0,45	1,38±0,52
Butírico*	10,65±9,52	10,89±8,47	12,19±9,14^a	9,53±6,55	7,95±7,14	10,35±4,69^b
Isovalérico*	2,02±1,42	1,92±1,31	1,76±0,87	1,86±0,54	1,83±0,75	2,02±0,88
Valérico*	1,65±1,02	1,57±1,02	1,51±0,91	1,72±0,84	1,31±0,56	1,78±0,63
Hexanoico*	0,62±0,73	0,69±0,59	0,74±0,72	0,75±0,79	0,35±0,32	0,89±0,77^b
Totales*	77,25±42,44	81,59±44,58	85,09±41,23	76,91±36,67	60,05±38,44	84,89±29,48^b

*Media de las muestras (mmol/Kg heces)

^aDiferencias significativas con respecto a familiares DQ+ en DSG p <0,03

^bDiferencias significativas con respecto a familiares DQ- en DSG p <0,03

Se analizó si aparecían diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos de familiares en función de la dieta. En los familiares DQ+ aparecieron diferencias significativas en el ácido butírico entre la DSG y la DN+15 g gluten/día. Esto parece indicar que el aumento en el consumo de gluten en estos familiares produce un incremento en la producción del butirato. Los familiares DQ- también presentaron un incremento significativo de algunos AGCC entre la DSG y la DN+15g gluten/día. En estos pacientes aparecían diferencias significativas en el ácido butírico, como en los familiares DQ+, así como en el acético y en el ácido hexanoico. Además hay un incremento en la producción de los AGCC totales entre DSG y la dieta en sobrecarga de gluten. Esto se puede ver de una manera más gráfica en la Figura 3.5 donde están representados los AGCC totales. Si se considera a todos los familiares como un conjunto sólo aparecen diferencias significativas entre DSG y DN+15g gluten/día para el butirato.

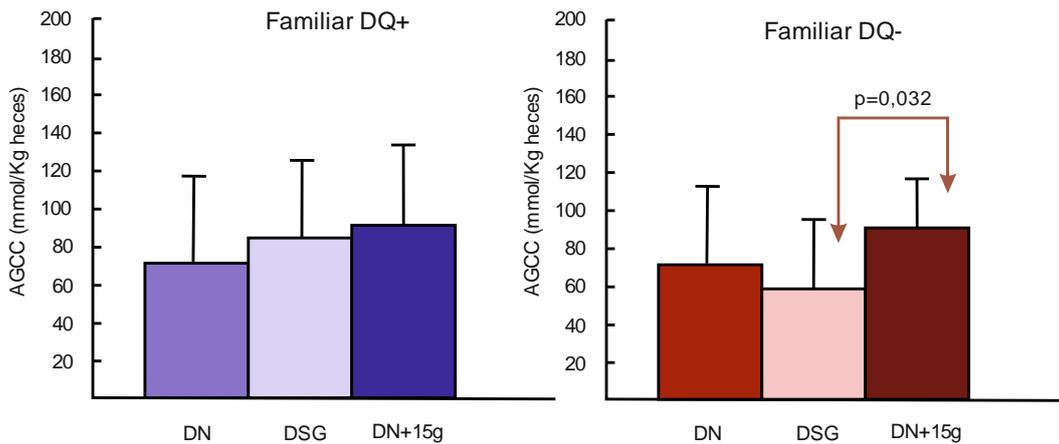


Figura 3. 5: Valores medios obtenidos de concentración de AGCC en familiares DQ+ y familiares DQ-en DN, DSG y DN+15 g gluten/día. AGCC: ácidos grasos de cadena corta, DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten, DN+15 g: dieta normal con ingesta de 15 g de gluten al día.

Los resultados obtenidos en sanos mostraron que una sobrecarga de gluten en la dieta era capaz de incrementar la mayoría de los AGCC fecales. Esto parece ser debido a una mayor llegada de gluten al intestino grueso que se convierte en sustrato de las bacterias colónicas. Como consecuencia del metabolismo bacteriano, se podrían generar AGCC que se excretan en las heces. Los resultados obtenidos en familiares muestran que la sobrecarga de gluten en la dieta es capaz de incrementar significativamente, con respecto a la DSG, el ácido acético, ácido hexanoico y los AGCC totales en familiares DQ-; y el ácido butírico en todos los familiares. Como discutimos anteriormente, parece que la dieta en sobrecarga de gluten que llevaron los familiares de pacientes celíacos, basada en una DN que se suplementaba con 15 g de gluten/día, presentaba menos contenido de gluten que la seguida por los voluntarios sanos, los cuales llevaban a cabo una DSG a la que se añadían 30 g de gluten/día de forma exógena. Esto podría ser debido a que los familiares, por diversos motivos, consumen menos gluten en su DN. Como se observa más adelante, la cantidad de gluten excretado por las heces en familiares en DN es inferior a la de sanos, lo que parece confirmar esta hipótesis. Además, los familiares DQ+ en DN presentaron una menor cantidad de gluten fecal que los familiares DQ-. Precisamente, es en los familiares DQ+ donde apenas se encuentran diferencias estadísticamente significativas para los AGCC entre dietas. Por tanto, la sobrecarga de gluten en familiares es capaz de incrementar los AGCC como se observó en sanos. Sin embargo, no se ven grandes diferencias significativas debido a que la dieta en

sobrecarga de gluten en familiares parece contener menos gluten que la seguida por los sanos.

3.4- La concentración de ácidos grasos de cadena corta es menor en sanos que en familiares y pacientes celíacos

En el apartado anterior se describieron diferencias en los AGCC fecales entre sanos y celíacos. El objetivo de este apartado fue comparar la concentración de los AGCC excretados en las heces de familiares de pacientes celíacos con respecto a sanos y pacientes con EC. Para ello, se cuantificaron los AGCC en las muestras fecales correspondientes a: 58 familiares DQ+ en DN, 13 familiares DQ- en DN, 11 voluntarios sanos en DN y 22 enfermos celíacos activos. Los resultados obtenidos para cada AGCC están representados en la Tabla 3.2. Al analizar la Tabla se observa que en los voluntarios sanos aparecía una concentración menor de AGCC con respecto a celíacos y familiares. Debido al gran número de muestras de familiares analizadas, la población seguía una distribución normal por lo que se utilizaron análisis estadísticos paramétricos. El análisis estadístico determinó que existen diferencias estadísticamente significativas para el ácido acético, propiónico, butírico, valérico y los AGCC totales a nivel poblacional. Estas diferencias se deben a la baja concentración de AGCC que aparecen en las heces de sanos.

Al comparar los resultados de familiares en DN con los de sanos en DN se observó que había diferencias estadísticamente significativas para el ácido acético, propiónico, butírico, valérico y los AGCC totales entre familiares DQ+ vs sanos. Además, al comparar los sanos en DN con los familiares DQ- en DN se observaron diferencias en estos mismos AGCC y en los AGCC ramificados (ácido isobutírico y ácido isovalérico). Sin embargo, no se detectaron diferencias entre las dos poblaciones de familiares estudiadas (DQ+ y DQ-), ni entre los familiares y los pacientes celíacos en DN. Estos resultados se pueden observar de una manera más gráfica en la Figura 3.6 donde están representados los valores de mediana, rangos e intercuartiles de los AGCC totales cuantificados en las muestras fecales de los cuatro grupos estudiados en DN. Se puede ver que los valores más bajos de AGCC totales aparecen en los sanos.

Tabla 3. 2: Valores medios de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en muestras fecales correspondientes a 16 sanos en DN, 22 celíacos en DN, 58 familiares DQ+ en DN y 13 familiares DQ- en DN. DN: dieta normal.

AGCC	Sano	Celiaco	Familiar DQ+	Familiar DQ-
	DN	DN	DN	DN
Ácido Acético*	26,76±12,23	42,68±19,97 ^a	48,22±26,11 ^a	49,42±24,42 ^a
Ácido Propiónico*	7,24±2,95	10,92±5,46 ^a	12,63±8,89 ^a	12,12±6,45 ^a
Ácido Isobutírico*	0,95±0,34	1,31±0,65	1,34±0,79	1,39±0,46 ^a
Ácido Butírico*	5,19±3,11	8,77±5,78 ^a	10,65±9,52 ^a	9,53±6,55 ^a
Ácido Isovalérico*	1,37±0,60	1,77±1,01	2,02±1,42	1,86±0,54 ^a
Ácido Valérico*	0,90±0,41	1,42±0,87	1,65±1,02 ^a	1,72±0,84 ^a
Ácido Hexanoico*	0,35±0,31	0,49±0,50	0,62±0,73	0,75±0,79
Totales*	42,85±14,75	67,52±28,81 ^a	77,25±42,44 ^a	76,91±36,67 ^a

*Media de las muestras (mmol/kg heces)

^aDiferencias significativas con respecto a sanos en DN p <0,03

En la Tabla 3.3 están representados los AGCC cuantificados en las muestras de heces de 57 familiares DQ+ en DSG, 13 familiares DQ- en DSG, 11 voluntarios sanos en DSG y 18 enfermos celíacos tratados. Como ocurre con la DN, aparecieron diferencias estadísticamente significativas en el acético, propiónico, butírico, valérico y AGCC totales entre los familiares DQ+ en DSG vs sanos DSG. Al comparar los AGCC de familiares DQ- en DSG vs sanos en DSG se observa que el ácido acético, el valérico y el isovalérico también son estadísticamente significativos y, en cambio, el propiónico, butírico, isobutírico y los AGCC totales no. Además, en estas condiciones dietéticas aparecieron diferencias significativas entre familiares y celíacos en los AGCC ramificados que no se detectaron en DN. Los familiares DQ- y familiares DQ+ presentaron un incremento del ácido isobutírico y el ácido isovalérico con respecto a los celíacos tratados. Estas diferencias detectadas pueden ser debidas a las condiciones de la dieta ya que los enfermos celíacos tratados llevan más tiempo con una retirada completa del gluten de la dieta.

Tabla 3. 3: Valores medios de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en muestras fecales correspondientes a 11 sanos en DSG, 18 celíacos en DSG, 57 familiares DQ+ en DSG y 13 familiares DQ- en DSG. DSG: dieta sin gluten.

AGCC	Sano	Celiaco	Familiar DQ+	Familiar DQ-
	DSG	DSG	DSG	DSG
Ácido Acético*	20,60±10,46	50,96±22,02 ^a	51,68±27,62 ^a	37,76±24,90 ^a
Ácido Propiónico*	5,82±2,27	14,78±9,80 ^a	13,43±9,73 ^a	9,52±6,71
Ácido Isobutírico*	0,90±0,49	0,93±0,43 ^a	1,32±0,77 ^b	1,30±0,45 ^b
Ácido Butírico*	4,22±2,15	9,95±5,54 ^a	10,89±8,47 ^a	7,95±7,14
Ácido Isovalérico*	1,18±0,55	1,18±0,60	1,92±1,31 ^{a,b}	1,83±0,75 ^{a,b}
Ácido Valérico*	0,77±0,42	1,28±0,62 ^a	1,57±1,02 ^a	1,31±0,56 ^a
Ácido Hexanoico*	0,36±0,33	0,50±0,48 ^a	0,69±0,59	0,35±0,32
Totales*	33,94±14,95	79,74±34,37 ^a	81,59±44,58 ^a	60,05±38,44

*Media de las muestras (mmol/kg heces)

^a Diferencias significativas con respecto a sanos en DSG $p < 0,03$

^b Diferencias significativas con respecto a celíacos en DSG $p < 0,03$

En el Capítulo 2 de Resultados se llevó a cabo un análisis comparativo entre la concentración de los AGCC fecales de pacientes celíacos y sanos. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los dos grupos. Numerosos trabajos han descrito un desequilibrio en la microbiota intestinal de los pacientes celíacos (85, 87), de modo que esta alteración en los AGCC fecales se asoció con la disbiosis intestinal que aparecía en los enfermos celíacos. En este apartado se cuantificaron los AGCC en las heces de familiares DQ+ y familiares DQ-. Sorprendentemente, los familiares, independientemente de la susceptibilidad genética a la enfermedad, presentaron un patrón de AGCC similar al de pacientes celíacos y diferente al de sanos. Esta diferencia en los AGCC entre familiares y sanos parece que no es debida a la ingesta de gluten en la dieta ya que los familiares mostraron una cantidad menor de gluten fecal en DN que los voluntarios sanos y, como vimos anteriormente, la producción de los AGCC sólo se ve influenciada por el consumo de grandes cantidades de gluten. Más factible parece una relación de la microbiota intestinal entre familiares y pacientes celíacos. La composición de la microbiota intestinal está muy influenciada por la genética del individuo, apareciendo similitudes en los patrones bacterianos de padres a hijos (291, 292). De hecho, hay trabajos que muestran que los genes que codifican

para el complejo mayor de histocompatibilidad influyen en la composición de la microbiota fecal (292). Precisamente, uno de los criterios de selección de los voluntarios sanos en este estudio es que no presentaran marcadores genéticos asociados a la EC, es decir, con un HLA-DQ-. Además, Tjellström B *et al.* (249) mostraron que familiares de primer grado de pacientes celíacos, independientemente del DQ, presentaban una producción anómala de AGCC con respecto a voluntarios sanos. Por tanto, los pacientes celíacos y familiares de primer grado pueden presentar una microbiota característica capaz de generar el incremento en la producción de los AGCC que se observa en este trabajo.

Los AGCC fecales de familiares de pacientes celíacos en DSG permanecían alterados con respecto a sanos. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los AGCC ramificados entre celíacos tratados y familiares en DSG. Los pacientes celíacos tratados excretan menos AGCC ramificados que los pacientes celíacos activos, aunque no aparecen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Esto puede ser debido al cambio en los hábitos alimenticios de los pacientes celíacos tratados y a la retirada del gluten de la dieta. El gluten está formado principalmente por proteínas y los componentes proteicos son los precursores exclusivos de los AGCC ramificados. Por tanto, parece lógico que los pacientes celíacos tratados presenten valores más bajos de ácido isobutírico e isoaléico con respecto a celíacos activos. Aunque los familiares llevaron a cabo una DSG durante un mes, ésta pudo no ser suficiente para modificar la microbiota intestinal capaz de generar los AGCC ramificados. De hecho, los valores de los AGCC fecales entre familiares en DN y familiares en DSG son similares. En cambio, los pacientes celíacos tratados llevaban más de un año con la retirada del gluten de la dieta, de modo que la microbiota intestinal puede verse profundamente afectada. La dieta es uno de los factores ambientales más importantes en la composición de la microbiota (235). Por tanto, las diferencias que se observan entre celíacos tratados y familiares en DSG pueden ser debidas a un escaso período en DSG por parte de los familiares.

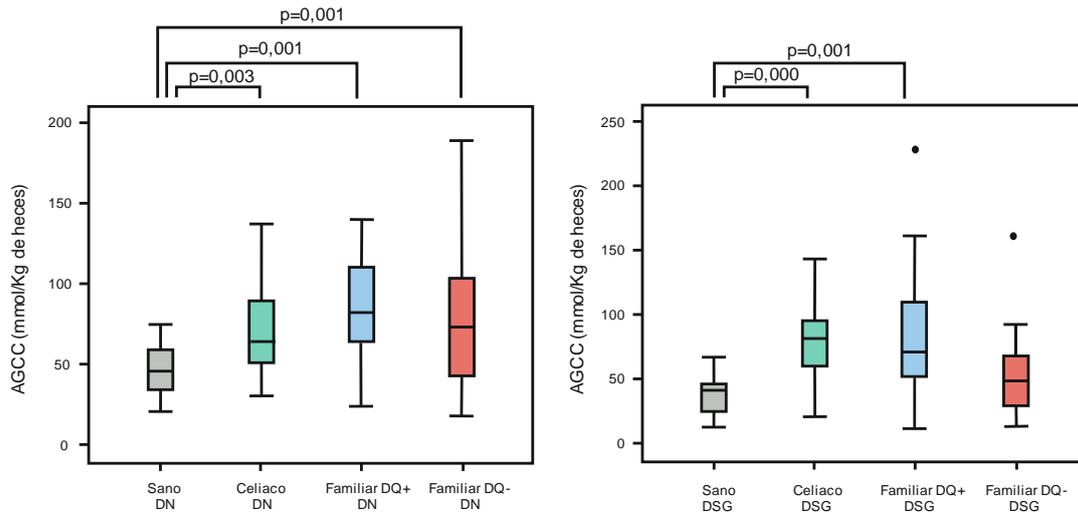


Figura 3. 6: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de concentración de los AGCC en las muestras fecales de sanos, celíacos, familiares DQ+ y familiares DQ- en DN y en DSG. AGCC: ácidos grasos de cadena corta, DN: dieta normal, DSG: dieta sin gluten.

3.5- Las heces de familiares presentan una concentración menor de gluten que las muestras fecales de sanos y mayor que las muestras de celíacos

En el Capítulo 2 de Resultados se había mostrado que los pacientes celíacos excretaban menos gluten en las heces que los voluntarios sanos. El objetivo de este apartado fue comparar el gluten que se excreta en las heces de familiares de pacientes celíacos con respecto a voluntarios sanos y pacientes con EC. Para ello, se cuantificó el gluten fecal de 14 voluntarios sanos en DN, 18 celíacos activos, 26 familiares DQ+ en DN y 12 familiares DQ- en DN. Los valores de medianas, rangos e intercuartiles correspondientes al gluten cuantificado en las muestras fecales en función del diagnóstico están representados en la Figura 3.7. Los resultados obtenidos muestran que el gluten presente en las heces es más alto en sanos y familiares DQ- que en celíacos activos. Además se llevó un análisis estadístico entre los voluntarios que presentaban un HLA positivo y aquéllos con un HLA negativo para la EC. De este modo en el primer grupo se englobaba a los pacientes celíacos y a los familiares DQ+; y en el segundo grupo a los voluntarios sanos y los familiares DQ-. El estudio comparativo mediante el test U de Mann-Whitney entre los dos grupos mostró diferencias fuertemente significativas ($p=0,002$).

Por otro lado, se puede observar que los grupos con una AGF menor en DN, como los sanos o los familiares DQ-, presentan una gran cantidad de gluten parcialmente digerido en las heces. En cambio, en los pacientes celíacos, que tienen una AGF elevada, apenas se detecta gluten en las heces. Este resultado podría indicar que la AGF influye en la cantidad de gluten excretado por las heces. Aunque ambos parámetros están influenciados por la cantidad de gluten ingerida en la dieta, se ha descrito que la AGF también depende bastante del individuo. Mediante el test Rho de Spearman se analizó la posible relación entre ambos análisis. Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos. Esto puede ser debido a que la presencia de gluten en las heces está más influenciada por el consumo de gluten en la dieta que la AGF.

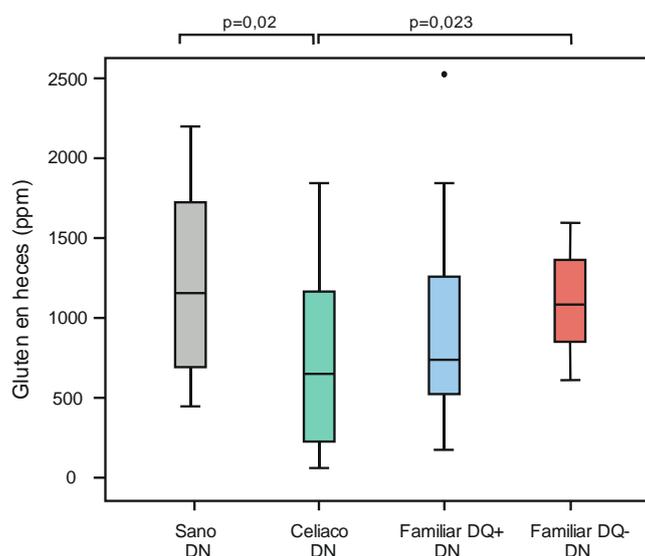


Figura 3. 7: Valores de mediana, rangos e intercuartiles de la concentración de gluten en las heces de sanos en DN, celíacos activos, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN. DN: dieta normal

En el Capítulo 2 de Resultados se detectó una reducción de gluten fecal en pacientes celíacos con respecto a voluntarios sanos. Este resultado se relacionó con tres factores: una posible reducción en la ingesta de gluten, un incremento de la permeabilidad intestinal y una mayor actividad de las proteasas intestinales en los pacientes celíacos. En este apartado se cuantificó el gluten fecal en familiares DQ+ y DQ-. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre celíacos y familiares DQ-. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas

entre los familiares DQ+ y los pacientes con EC. Como se observó anteriormente, la presencia de gluten en las heces está relacionada con la ingesta de gluten en la dieta. Todos los familiares que llevaron a cabo el estudio eran padres y hermanos de niños celíacos. Aunque estudios previos han mostrado que los familiares de pacientes celíacos presentan una ingesta de gluten similar a los sanos (7), parece normal que los familiares de primer grado de niños celíacos consuman menos gluten en su DN, adaptándose a la dieta especial del paciente celíaco. Además, los pacientes DQ+, si sospechaban su predisposición genética a padecer la EC, es posible que evitaran el consumo de alimentos con gluten. Por tanto, parece factible que los familiares DQ+ consumieran menos gluten en la dieta durante el estudio.

Al comparar los voluntarios que presentaban un HLA positivo (familiares DQ+ y celíacos) con aquellos que presentaban un HLA negativo (sanos y familiares DQ-) aparecían diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, no podemos descartar una posible relación entre el descenso del gluten fecal y la presencia de un HLA positivo. Sin embargo, este resultado puede deberse a otros factores como la actividad proteolítica intestinal. En el Capítulo 2 se especuló con que la reducción del gluten en las heces de pacientes celíacos se podía corresponder a un incremento en la AGF. Los grupos con una menor AGF en DN, como los sanos o los familiares DQ-, presentaban una gran concentración de gluten en las heces. Así mismo, en los pacientes celíacos y familiares DQ+, que tienen una AGF elevada, se detecta menos gluten fecal. Este resultado parece indicar que la AGF influye en la cantidad de gluten excretado por las heces. La AGF está relacionada con la actividad proteolítica frente al péptido 33-mer, la cual podría hidrolizar el epítipo del 33-mer que reconoce el anticuerpo G12, detectándose menos gluten en las heces. Sin embargo, no aparece una correlación significativa entre el gluten excretado en las heces y la AGF. Esto podría ser debido a que la presencia del gluten parcialmente digerido en las heces es muy dependiente de su consumo en la dieta. En cambio, la AGF, aunque también se ve afectada por la ingesta de gluten, va a ser característica de cada individuo, encontrándose individuos que presentan una AGF muy elevada y otros con una actividad muy baja. Por tanto, la concentración de gluten en las heces de familiares parece depender de la ingesta del gluten dietético y de la AGF de cada individuo.

3.6- Hay correlación entre la AGF y la actividad peptidásica frente al 33-mer de las muestras fecales

Algunas muestras fecales presentan actividad peptidásica frente al péptido 33-mer. El objetivo de este apartado fue analizar la actividad peptidásica en las heces de familiares de pacientes celíacos. Para ello se incubaron con el péptido 33-mer las muestras fecales de 8 familiares DQ+ y de 3 familiares DQ- a distintos tiempos ($t=2h$, $t=6h$, $t=8h$ y $t=12h$). En la Figura 3.8 A se representan los tiempos que fueron necesarios para que las muestras fecales hidrolizaran completamente el péptido 33-mer en función del diagnóstico. Se consideró que el péptido estaba hidrolizado cuando se reducía el área de pico al menos un 90%. En la Figura 3.8 A se observa que un 57% de las muestras fecales, independientemente del diagnóstico, eran capaces de hidrolizar completamente el péptido 33-mer. También se observa que las muestras de heces de sanos y familiares de celíacos tienen menos capacidad para digerir el 33-mer que los pacientes celíacos. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en función del diagnóstico.

Por otro lado, en los Capítulos previos, aunque no se encontró ninguna relación significativa entre las actividades proteolíticas fecales y la capacidad de las heces para hidrolizar el péptido 33-mer, si se observó que los sobrenadantes fecales con mayor AGF eran capaces de hidrolizar este péptido en menos tiempo. En este apartado, al incrementar el tamaño muestral, si aparece una correlación significativa entre la AGF y la actividad peptidásica fecal frente al 33-mer. En la Figura 3.8 B se muestra una gráfica que correlaciona la hidrólisis del 33-mer en el tiempo con respecto a los valores de AGF obtenidos en sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN, celíacos en DSG, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN. En esta Figura se puede observar claramente que la mayoría de las muestras que presentan una AGF elevada son capaces de hidrolizar el péptido 33-mer en menos tiempo, independientemente del diagnóstico y de la dieta.

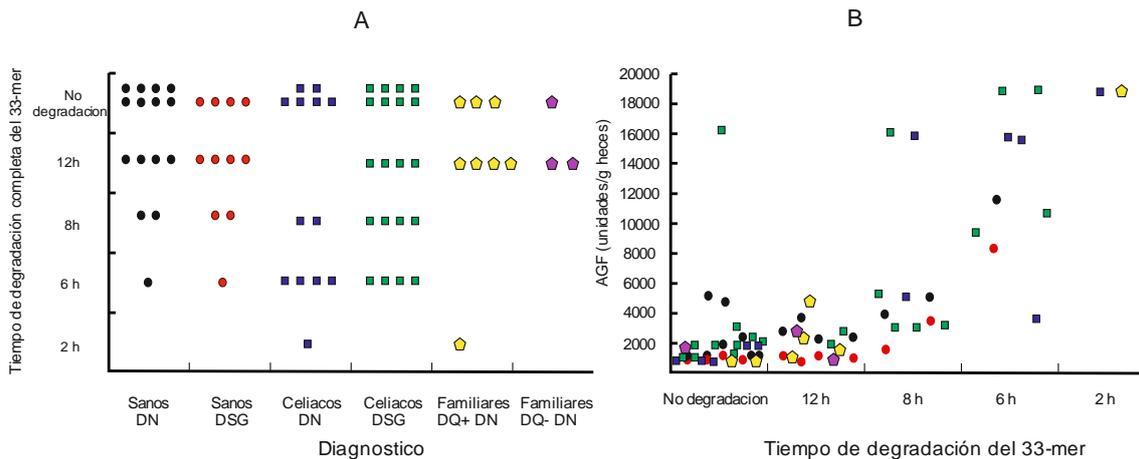


Figura 3. 8: A, Esquema en el que está representado el tiempo necesario para la degradación del 33-mer por parte de las heces de sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN, celíacos en DSG, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN B, Correlación entre los valores obtenidos de AGF y la actividad peptidásica frente al 33-mer en sanos en DN, sanos en DSG, celíacos en DN, celíacos en DSG, familiares DQ+ en DN y familiares DQ- en DN. Los puntos negros corresponden a los valores obtenidos en sanos en DN, los puntos rojos a la DSG de sanos, los recuadros azules a celíacos activos, los verdes a celíacos en DSG, los rombos amarillos a familiares DQ+ en DN y los rombos morados a los familiares DQ- en DN. DN:dieta normal, DSG:dieta sin gluten.

Las proteasas humanas presentes en el tracto digestivo no son capaces de hidrolizar el péptido 33-mer (25). Por lo tanto, la actividad peptidásica frente al 33-mer que detectamos en las heces parece provenir de la actividad metabólica microbiana en el intestino grueso. Los resultados obtenidos muestran una relación significativa entre la AGF y la actividad peptidásica frente al 33-mer, independientemente de la dieta. Previamente, se había descrito que la AGF de pacientes celíacos era mayor que la de los voluntarios sanos y familiares de celíacos. Esto podría explicar porque hay una mayor proporción de muestras fecales de pacientes celíacos capaces de hidrolizar el péptido 33-mer y porque muchas de estas muestras son capaces de degradar el péptido en menos tiempo que las muestras de familiares de celíacos y de voluntarios sanos. Numerosos trabajos muestran un desequilibrio en la microbiota intestinal entre sanos y celíacos (85, 89). Incluso se ha descrito un patrón de proteasas bacterianas degradadoras de gliadina en la mucosa duodenal de pacientes celíacos que no aparece en sanos (142). Por tanto, los pacientes celíacos pueden presentar una microbiota proteolítica característica capaz de generar una AGF mayor y, en algunos casos, un incremento en la actividad peptidásica frente al 33-mer.

3.7- Discusión general

El componente genético de la EC es indudable. Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad que conforman el sistema HLA de clase II están relacionados con la enfermedad (65), de modo que todos los pacientes celíacos presentan los heterodímeros HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (66, 67). Estos heterodímeros juegan un papel central en la patogénesis de la enfermedad debido a que se encuentran en la membrana de las células presentadoras de antígeno y tienen alta afinidad por los péptidos del gluten desaminados por la transglutaminasa tisular (28). Sin embargo, los alelos que codifican para estas moléculas se encuentran en un 30-40% de la población mundial, de los cuales se estima que tan solo un pequeño porcentaje desarrolla la EC. Por tanto, la presencia de las proteínas HLA es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la EC (27, 28). Es más, se estima que los genes HLA aportan no más del 40% del riesgo genético de la enfermedad. El otro 60% restante sería debido a la acción de numerosos genes de efecto menor (68). Además, se ha descrito que otros factores ambientales como la microbiota intestinal y los patrones de lactancia pueden tener un papel clave en el desarrollo de la EC (72). En el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral se especuló que podría existir un metabolismo bacteriano del gluten diferente entre celíacos y no celíacos. Por tanto, el objetivo del Capítulo 3 fue el estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en familiares con un HLA-DQ susceptible a la EC (familiar DQ+) y familiares de celíacos sin susceptibilidad genética (familiar DQ-). A partir de estos resultados se realizó un estudio comparativo entre el metabolismo del gluten entre sanos, celíacos y los dos grupos de familiares analizados.

Todos los componentes de la dieta que escapan a la digestión en el intestino delgado, como las proteínas del gluten, se convierten en sustrato de las bacterias colónicas en el intestino grueso. Por tanto, la ingesta de gluten en la dieta es capaz de incrementar la actividad metabólica microbiana en el intestino grueso generándose un aumento en determinadas actividades proteolíticas, así como en la concentración de los AGCC, en las muestras fecales de sanos. Los resultados obtenidos en este Capítulo parecen indicar que el consumo de gluten en los familiares de pacientes celíacos también incrementa la actividad metabólica microbiana. En los grupos de familiares se observó un incremento de la ATF, la AGF, la actividad PEPF y los AGCC cuando se ingería una sobrecarga de gluten en la dieta. Sin embargo, sólo aparecieron diferencias estadísticamente significativas en la AGF y en algunos AGCC. La explicación a este hecho parece ser un menor consumo de gluten en la dieta seguida por los familiares de pacientes celíacos. Por tanto, parece que el metabolismo

microbiano responde a la ingesta de gluten en la dieta de la misma manera en familiares de celíacos y voluntarios sanos, y las diferencias obtenidas en los resultados se deben a una dieta diferente entre ambos grupos.

Sin embargo, la composición de la microbiota intestinal parece que puede diferir entre sanos y familiares de celíacos. Se ha observado que el patrón de AGCC en familiares de celíacos, independientemente de la susceptibilidad genética, es similar al obtenido en pacientes celíacos, encontrándose diferencias significativas con sanos. Este resultado parece indicar que al menos una parte de la microbiota intestinal es similar entre celíacos y familiares de celíacos. La microbiota humana está muy influenciada por la genética del individuo, apareciendo similitudes en los patrones bacterianos de familiares de primer grado (291, 292). Esta microbiota similar entre pacientes celíacos y familiares de celíacos puede generar una actividad metabólica microbiana análoga capaz que generar una producción de AGCC similar entre ambos grupos. No es la primera vez que se detectan diferencias en la cantidad de AGCC fecales entre sanos y familiares de pacientes celíacos. Tjellström B *et al.* (249) mostraron que los familiares de primer grado de pacientes celíacos, independientemente del DQ, presentaban una producción anómala de AGCC con respecto a voluntarios sanos. En definitiva, los pacientes celíacos y familiares de primer grado pueden presentar una microbiota característica capaz de generar el incremento en la producción de los AGCC que se observa en este trabajo.

Por el contrario, los familiares de celíacos, como ocurría con los voluntarios sanos, presentan una menor ATF y AGF que los pacientes celíacos. En el Capítulo 2 se especuló con que las diferencias en estas actividades proteolíticas entre sanos y celíacos podrían ser debidas a la disbiosis intestinal que aparece en pacientes celíacos. Aunque la excreción de AGCC fecales en celíacos y familiares de celíacos parece indicar que estos grupos presentan una microbiota similar, es posible que los celíacos tengan una comunidad de bacterias proteolíticas diferente a la que aparece en familiares. Este resultado es de interés ya que muestra diferencias entre los pacientes celíacos y los familiares susceptibles a padecer la EC. Además, obliga a hacerse una pregunta ¿Podría existir un metabolismo del gluten, de origen microbiano, diferente entre celíacos y no celíacos? Bernardo D *et al.* (142) mostraron que los pacientes celíacos presentan en la mucosa duodenal unas proteasas capaces de degradar gliadina que no aparecen en sanos. Estas proteasas pueden atravesar el intestino grueso y ser excretadas por las heces formando parte de la ATF y la AGF que detectamos en este trabajo. Además, se han descrito cepas proteolíticas dentro de los grupos bacterianos que aparecen frecuentemente alterados en pacientes

celiacos. Por ejemplo, cepas de *Bifidobacterium* son capaces de degradar péptidos del gluten que son generados tras la digestión por las enzimas digestivas humanas (146). Lo mismo ocurre con el género *Bacteroides* que aparece alterado tanto en celiacos activos como en celiacos tratados. Se ha mostrado que cepas de *Bacteroides fragilis* son capaces de degradar gliadinas (237). Por tanto, los pacientes celiacos pueden presentar una microbiota proteolítica diferente a la de sanos y familiares, capaz de generar una anormal ATF y AGF en pacientes celiacos, y que podría participar en el proceso patológico de la EC. Sin embargo, son necesarios más trabajos en esta dirección.

En este Capítulo también se observa una excreción menor de gluten en las heces de pacientes celiacos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a sanos y familiares DQ-. Aunque la concentración de gluten fecal puede variar en función a distintos factores como la ingesta de gluten en la dieta, parece que la actividad proteolítica intestinal puede influir fuertemente. En este apartado se ha mostrado que los grupos con una AGF menor, como los sanos o los familiares DQ-, presentan una concentración elevada de gluten en las heces. En cambio, en los pacientes celiacos, que tienen una AGF alta, se detecta menos gluten fecal. Además, se ha descrito una correlación significativa entre la AGF y la actividad peptidásica fecal frente al 33-mer. El anticuerpo utilizado en la detección de gluten fecal reconoce una región del péptido inmunotóxico del 33-mer, por lo que parece lógica la relación inversa entre la AGF y la detección de gluten en las heces. Por tanto, la presencia de menos gluten fecal en pacientes celiacos también parece indicar que existe un metabolismo microbiano diferente entre celiacos y no celiacos.

En conclusión, los pacientes celiacos pueden presentar un metabolismo microbiano distinto respecto a sanos y familiares de celiacos. El hecho de que los familiares de pacientes celiacos no compartan el incremento en las actividades proteolíticas fecales, y la reducción de la concentración del gluten excretado en heces, que muestran los pacientes celiacos, parece indicar que estos pacientes presenten un metabolismo de gluten anormal.

4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL IMPLICADA EN EL METABOLISMO DEL GLUTEN EN SANOS, CELIACOS Y FAMILIARES DE CELIACOS

Las proteínas del gluten son resistentes a la digestión completa por las enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal (25). Como consecuencia, en el intestino delgado se generan péptidos relativamente grandes ricos en prolina y glutamina. Todos los componentes de la dieta que escapan a la digestión de las proteasas digestivas humanas, como ocurre con parte de las proteínas del gluten, son sustratos potenciales para las bacterias en el lumen intestinal. Sin embargo, con frecuencia se subestima el papel de la microbiota intestinal en la hidrólisis de las proteínas (122). El objetivo del Capítulo 4 fue la identificación y caracterización de las bacterias intestinales capaces de participar en el metabolismo del gluten en el tubo digestivo humano. Para llevar a cabo este objetivo, se recogieron muestras fecales de: 7 voluntarios sanos, 5 celíacos activos y 10 familiares de pacientes celíacos. Las muestras fecales fueron incubadas durante 48h, en condiciones anóxicas estrictas, en 3 medios de cultivo (medios MCG) con gluten como principal fuente de nitrógeno. La caracterización de la microbiota se realizó a nivel molecular mediante PCR-DGGE del cultivo en medio líquido MCG-3, y también por aislamiento de las bacterias mediante cultivo de las muestras fecales en los tres medios MCG sólidos (siembra directa de las muestras fecales y tras la incubación de 48 h en medio líquido). Así mismo, se analizó la capacidad de las heces para consumir el gluten presente en el medio, mediante la técnica de ELISA, empleado el kit Gluten tox (Biomedal) (Figura 4.1).

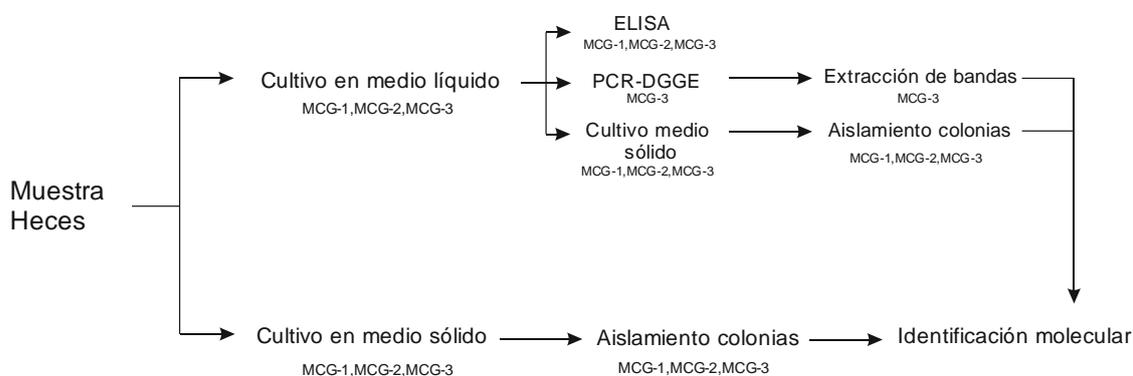


Figura 4. 1: Esquema general del procedimiento llevado a cabo en el Capítulo 4.

4.1- Las muestras fecales presentan una mayor actividad proteolítica en el MCG-3

El objetivo del Capítulo 4 de Resultados fue caracterizar la microbiota fecal que participa en el metabolismo del gluten. Para ello, fue necesaria la obtención de medios de cultivo que permitiesen la proliferación de bacterias capaces de emplear las proteínas del gluten como nutrientes. Se diseñaron 3 medios de cultivo diferentes que presentaban gluten como única o principal fuente de nitrógeno. En este apartado, se analizó la capacidad de estos tres medios de cultivo (MCG-1, MCG-2, MCG-3) para favorecer el crecimiento de microorganismos que produzcan actividades proteolíticas frente al gluten. Las muestras fecales de 7 voluntarios sanos fueron incubadas en los tres medios durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se empleó el kit ELISA GlutenTox para cuantificar el gluten no consumido que quedaba en el medio de cultivo. En la Tabla 4.1 se puede observar que las muestras fecales cultivadas en el medio MCG-3 presentaban mayor consumo de gluten. Aproximadamente el 40% de las muestras fecales cultivadas en MCG-3 fueron capaces de hidrolizar prácticamente todo el gluten presente en el medio de cultivo. En cambio, en el MCG-1 y el MCG-2, aunque también aparece consumo del gluten tras la incubación, este no excedía el 70% del gluten presente en el medio de cultivo. Por tanto, el MCG-3 parece el mejor medio para caracterizar las bacterias intestinales que participan en el metabolismo del gluten.

Tabla 4. 1: Estudio del consumo de gluten en los cultivos de 7 muestras fecales de voluntarios sanos en MCG-1, MCG-2 y MCG-3.

	0-40% de degradación (%)	40-70% de degradación (%)	70-100% de degradación (%)
MCG-1	43% (3/7)	57% (4/7)	0% (0/7)
MCG-2	29% (2/7)	57% (4/7)	14% (1/7)
MCG-3	28,5% (2/7)	28,5% (2/7)	43% (3/7)

4.2- No aparecen diferencias en el consumo de gluten en los cultivos fecales en MCG-3 en función del diagnóstico

Los resultados del Capítulo 2 mostraron que las muestras fecales de pacientes celíacos presentan mayor actividad glutenásica que las muestras fecales de sanos y familiares. En este apartado se analizó si aparecían diferencias en el consumo del gluten, en los cultivos fecales en MCG-3, en función del diagnóstico. Para ello, se incubaron las muestras fecales de: 7 voluntarios sanos en DN, 5 celíacos activos y 10 familiares de celíacos en DN en el medio MCG-3 durante 48h. Tras la incubación, se empleó el kit ELISA Gluten tox (Biomedal) para cuantificar la cantidad de gluten no consumido que quedaba en el medio. Los resultados que se obtuvieron están presentes en la Tabla 4.2. Como se puede observar en la Tabla, no se detectaron diferencias en el consumo de gluten de los cultivos fecales en función del diagnóstico. Sin embargo, el tamaño muestral analizado es muy pequeño. La capacidad degradadora depende de la muestra fecal, encontrando muestras que apenas eliminan el gluten del medio y otras que lo degradan totalmente. Aproximadamente un 40% de las heces empleadas fueron capaces de eliminar prácticamente todo el gluten del medio de cultivo. Por el contrario, un 27% de las muestras apenas degradaron el gluten presente en el medio.

Tabla 4. 2: Estudio del consumo de gluten en los cultivos de muestras fecales en MCG 3de: 7 sanos, 5 celíacos activos y 10 familiares en dieta normal.

	0-40% de degradación (%)	40-70% de degradación (%)	70-100% degradación (%)
Sanos	28,5% (2/7)	28,5% (2/7)	43% (3/7)
Celíacos	20% (1/5)	40% (2/5)	40% (2/5)
Familiares	30%(3/10)	30% (3/10)	40% (4/10)

4.3- Las muestras fecales presentan múltiples bacterias proteolíticas que pueden participar en el metabolismo del gluten

El objetivo de este apartado fue la caracterización y el aislamiento de las bacterias intestinales que podrían participar en el metabolismo del gluten en los seres humanos. Para llevar a cabo este objetivo se recogieron muestras fecales de: 7

voluntarios sanos, 5 pacientes celíacos activos y 10 familiares de pacientes celíacos. Estas muestras fecales fueron incubadas en los medios líquidos de MCG-1, MCG-2 y MCG-3 a 37 °C, durante 48 h y en condiciones anóxicas. Transcurrido ese tiempo, se sembraron diluciones seriadas de los diferentes cultivos líquidos en placas de petri con el medio MCG correspondiente sólido. Así mismo, también se sembraron diluciones seriadas de las muestras fecales directamente, sin incubar previamente en medio líquido, en los tres medios MCG sólidos. Las placas se mantuvieron a 37 °C durante 48 h en condiciones anóxicas. Después de incubar se llevó a cabo un análisis de *visu* de las distintas morfologías de las colonias crecidas en los tres medios. Se aislaron todas las colonias con morfología diferente. Sin embargo, solamente se identificaron aquellas colonias en las que se detectaba un halo degradativo alrededor de la colonia y aquellas colonias que requerían el gluten para crecer. Para realizar la identificación molecular, se extrajo el ADN de los cultivos puros de cada colonia y se llevó a cabo una reacción de PCR empleando los cebadores 27F/E939R. Los productos de PCR de aproximadamente 900 pb fueron clonados empleando el kit comercial *StrataClone PCR cloning* (Stratagene). 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 (*Basic Local Alignment Search Tools*). Para completar la identificación molecular de cada una de las secuencias, se construyó un árbol filogenético con el programa informático MEGA versión 5.

Los microorganismos obtenidos eran muy dependientes del medio utilizado y del individuo al que pertenecía la muestra fecal. En la Figura 4.1 está representado un diagrama sectorial en el que se muestra la diversidad microbiana obtenida en los medios MCG-1, MCG-2 y MCG-3. El MCG-3 fue el medio de cultivo donde se obtuvo una diversidad mayor.

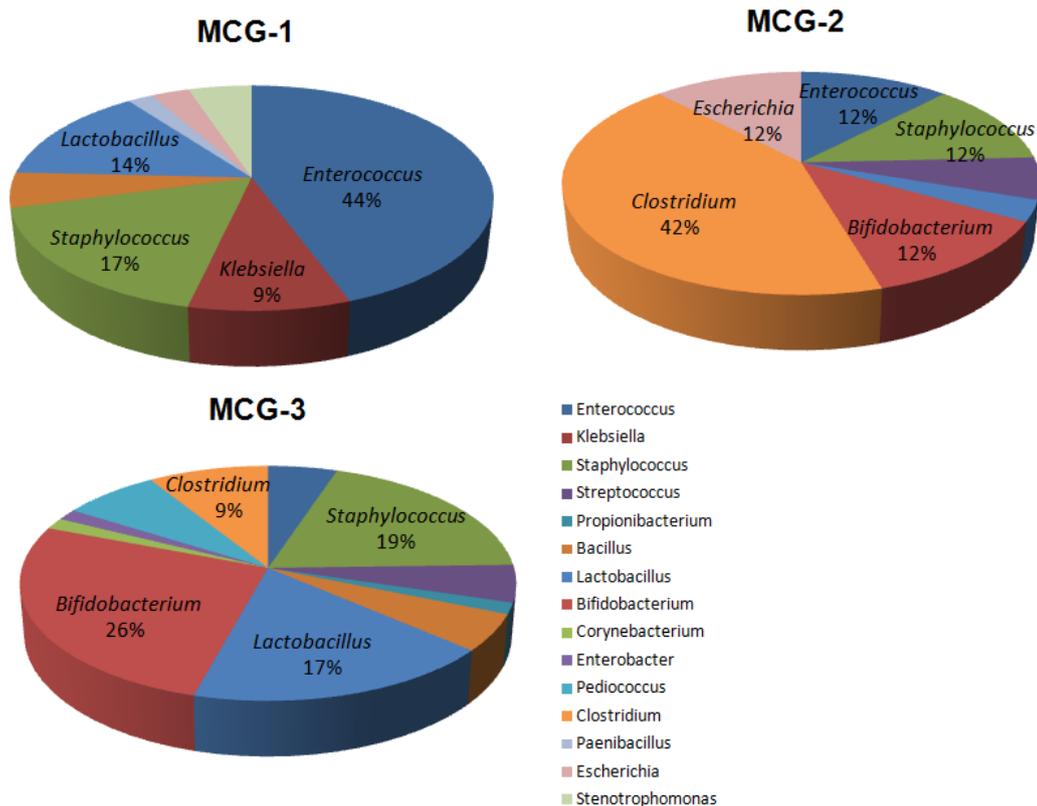


Figura 4. 2: Diagrama sectorial mostrando la diversidad microbiana a nivel de género que se desarrolla en cada uno de los medios con gluten empleados: MCG-1, MCG-2 y MCG-3.

El MCG-1 es un medio muy restrictivo, con gluten como única fuente de nitrógeno. En principio, las bacterias que son capaces de crecer en este medio deberían ser capaces de utilizar las proteínas del gluten presentes en el medio de cultivo, ya que es la única fuente de nitrógeno en el MCG-1. Sin embargo, también podrían proliferar bacterias que fijen el nitrógeno atmosférico. Este puede ser el caso de las cepas de *Klebsiella* aisladas del MCG-1. La diversidad de bacterias aisladas con este medio no fue muy elevada. El 44% de los microorganismos que se identificaron correspondieron al género *Enterococcus*. Las cepas bacterianas de este género que fueron caracterizadas pertenecían a *E. faecalis* y *E. faecium*. Estas cepas presentaban una morfología muy característica con colonias transparentes muy pequeñas y una elevada actividad proteolítica frente al gluten. Aunque también se obtuvieron cepas sin actividad glutenásica. Otros géneros que se aislaron en MCG-1 fueron *Staphylococcus* (17%), *Lactobacillus* (14%), *Klebsiella* (9%), *Stenotrophomonas* (5%), *Bacillus* (5%), *Escherichia* (2%) y *Paenibacillus* (2%). La mayoría de las cepas aisladas de estos géneros no eran capaces de crecer cuando se retiraba el gluten del

medio de cultivo. Además, las cepas de los géneros *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus* eran capaces de generar un halo degradativo alrededor de la colonia.

El MCG-2 se caracterizó por presentar una gran proliferación de cepas bacterianas que no necesitaban el gluten para crecer. Este medio, es un medio de cultivo rico en nutrientes puesto que lleva gran cantidad de extracto de carne (2 g/L) y peptona de carne (5 g/L) que podrían favorecer el crecimiento de microorganismos no relacionados con el metabolismo del gluten. Sin embargo, sólo se identificaron aquellas cepas bacterianas capaces de degradar el gluten, o que requerían su presencia para crecer. Las bacterias aisladas e identificadas pertenecieron a los siguientes géneros: *Clostridium* (42%), *Enterococcus* (12%), *Escherichia* (12%), *Staphylococcus* (12%), *Bifidobacterium* (12%), *Streptococcus* (6%) y *Lactobacillus* (3%). Las cepas del género *Clostridium* fueron las más abundantes en MCG-2 y pertenecían a cuatro especies bacterianas diferentes: *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. botulinum/sporogenes* y *C. butyricum/beijerinckii*. Estas bacterias son anaerobias estrictas, con aspecto mucoso y presentan actividad glutenásica. Además, cepas bacterianas de *Staphylococcus* y *Enterococcus*, aisladas de este medio, también presentaron actividad proteolítica frente al gluten. La gran cantidad de especies bacterianas que presentaban morfologías de colonia similares en el MCG-2 hizo imposible analizar si existían diferencias a nivel de diagnóstico.

El MCG-3 presentó la mayor diversidad de bacterias relacionadas con el metabolismo del gluten con respecto al resto de medios de cultivo analizados. Las cepas bacterianas aisladas e identificadas del medio MCG-3 pertenecieron a 11 géneros diferentes y muchas especies se aislaron de una única muestra fecal. En este medio proliferaban principalmente bacterias de los géneros *Bifidobacterium* (26%), *Staphylococcus* (19%) y *Lactobacillus* (17%). La mayoría de las bacterias pertenecientes a estos géneros no mostraban actividad proteolítica extracelular en el medio de cultivo sólido. Sin embargo, no crecían cuando se eliminaba el gluten del medio, por lo requerían la presencia de gluten para crecer. Otras bacterias aisladas de forma minoritaria de MCG-3, y que necesitaban gluten para crecer, pertenecían a los géneros *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Así mismo, también se aislaron bacterias con actividad glutenásica que pertenecían a los géneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Propionibacterium*. Además, dentro de los géneros *Bifidobacterium* y *Staphylococcus* algunas cepas como *B. longum* F-20 o *S. epidermidis* A-27, presentaban actividad proteolítica frente al gluten. La diversidad microbiana que aparece en el medio, junto con la similitud en la morfología de las

colonias pertenecientes a los géneros mayoritarios, hizo imposible llevar a cabo un estudio a nivel de diagnóstico.

En total, entre los tres medios, se aislaron e identificaron 144 cepas bacterianas relacionadas con el metabolismo del gluten, que pertenecían a 35 especies bacterianas diferentes, y se englobaban en 15 géneros distintos. Las cepas identificadas se muestran en la Tabla 4.3. La mayoría pertenecían al filo *Firmicutes*, aunque también se aislaron bacterias de los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. La presencia de bacterias que necesitan gluten para crecer en el intestino parece mostrar que la microbiota del tracto digestivo puede tener un papel importante en el metabolismo del gluten de humanos. Además, estas bacterias podrían presentar actividades proteolíticas que no presentan las enzimas digestivas humanas, permitiendo la hidrólisis de compuestos no digeribles en el intestino de humanos, como son las proteínas del gluten. Por tanto, las bacterias aisladas en este Capítulo podrían hidrolizar los péptidos del gluten generando dipéptidos y tripéptidos fácilmente asimilables por el hospedador.

Tabla 4. 3: Microorganismos aislados tras el cultivo de las muestras fecales de 7 voluntarios sanos, 5 celíacos activos y 10 familiares de pacientes celíacos en tres medios de cultivo diferentes: MCG-1, MCG-2 y MCG-3.

Filo	Orden	Género	Especie	Cepas	Medio
Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcus	<i>E. faecalis</i>	A-1,A-2,A-3,A-4,A-5,A-6,A-47, A-45,A-62,A-63,A-138,HF1,HF2	MCG1,2,3
			<i>E. faecium</i>	A-7,A-8,A-9,A-32,A-33,A-97	MCG1,2,3
		Lactobacillus	<i>L. mucosae</i>	A-67,A-68,A-71,A1a, B1c,B2b,B3a,LB1a,D2a,D2d, D5a1,LD1a,LE1a	MCG1,2,3
			<i>L. amylovorus</i>	A2c,LA1b,D1d,D3b,D4a, D5a2,E1a	MCG1,3
			<i>L. gasseri</i>	A-108	MCG3
			<i>L. ruminis</i>	A-39,A-44	MCG3
			<i>L. fermentum</i>	A-17	MCG3
		<i>L. rhamnosus</i>	LA2a,LA2d,D1a,LD2a,LE2a,LE3	MCG1,3	
		Pediococcus	<i>P. acidilactici</i>	A-111,A-113,A-116,A-118	MCG3
		Streptococcus	<i>S. sanguinis</i>	A-105,A-101	MCG2,3
	<i>S. gallolyticus</i>		A-65	MCG2	
	<i>S. intermedius/ constellatus/anginosus</i>		A-38	MCG3	
	Bacillales	Bacillus	<i>B. licheniformes</i>	A-104,A-109,A-110	MCG3
			<i>B. pumilus</i>	HC2,HC6,HC9	MCG1
			<i>B. subtilis</i>	HA4,HA5	MCG1
		Paenibacillus	<i>P. jamilae/peoriae</i>	B4a,B4a2	MCG1
		Staphylococcus	<i>S. epidermidis</i>	A-15,A-16,A-25,A-27,A-28, A-64,A-106,A-139,A-140	MCG1,2,3
			<i>S. hominis</i>	A,36,A-42,A-78	MCG1,2,3
			<i>S. haemolyticus</i>	A-18,A-100,E3c	MCG2,3
			<i>S. saprophyticus</i>	A-43	MCG3
			<i>S. warneri/pasteuri</i>	A-46	MCG3
		<i>S. aureus</i>	A-47,A-58	MCG3	
	Clostridiales	Clostridium	<i>C. botulinum/ sporogenes</i>	A-30,A-49,A-102,A-103, A-117,A-119,A-141	MCG2,3
<i>C. perfringens</i>			A-40,A-41,A-74, A-75,A-76,A-77	MCG2,3	
<i>C. sordellii</i>			A-19,A-20,A-21,A-22	MCG2	
<i>C. butyricum/ beijerinckii</i>			A-114,A-115	MCG2	
Actinobacteria	Actinomycetales	Corynebacterium	<i>C. pseudogenitalium/ accolens</i>	A-31	MCG3
		Propionibacterium	<i>P. acnes</i>	A-107,A-137	MCG3
		Bifidobacterium	<i>B. longum</i>	A-11,A-12,A-26,A-35,A-48,A-66, A-73,A-95,A-98,A-99,A-122, A-125,	MCG2,3
			<i>B. adolescentis</i>	A-10,A-34,A-72	MCG1,2,3
			<i>B. catenulatum/ pseudocatenulatum</i>	A-123,A-124	MCG3
			<i>B. animalis</i>	A-120,A-121	MCG3
Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	<i>E. aerogenes</i>	A-81	MCG3
		Klebsiella	<i>K. pneumoniae</i>	A-80,A-96,HD1,HD2	MCG1
		Escherichia/ Shigella	<i>E.coli/S.flexneri</i>	A-13,A-14,A-23,A-24,A-60,A-61	MCG1,2
	Xantomonadales	Stenotrophomonas	<i>S. maltophilia</i>	HE1,HE2,HB1.HB3,HB9,HB18	MCG1

4.4- Muchas cepas presentaron actividad proteolítica frente al gluten y frente a la gelatina

Las bacterias aisladas e identificadas en este Capítulo se seleccionaron en función de su relación con el metabolismo del gluten. De este modo se seleccionaron aquellas colonias que: (I) presentaban actividad glutenásica y (II) eran incapaces de crecer en los mismos medios en los que fueron aislados retirando el gluten. En todas las cepas identificadas se analizó la actividad proteolítica frente a las proteínas del gluten y frente a la gelatina. Para ello, se comprobó si aparecía un halo degradativo alrededor de la colonia en medios con gluten y en medios con gelatina. En la Figura 4.2 se muestran ejemplos de bacterias proteolíticas que degradaban el gluten del medio.

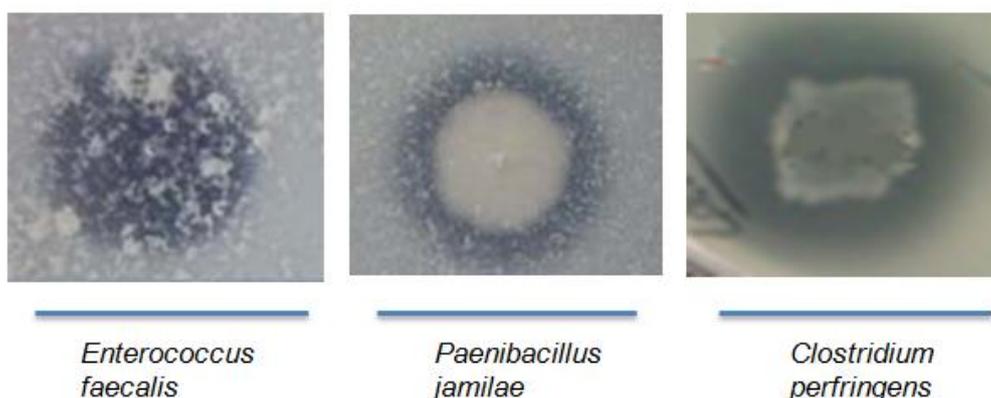


Figura 4. 3: Colonias con actividad proteolítica frente a las proteínas del gluten. Se observa un halo degradativo alrededor de las colonias.

Los resultados del ensayo de las actividades proteolíticas se muestran en la Tabla 4.4. Como se puede observar en la Tabla, todas las cepas bacterianas que generaron un halo degradativo en los medios con gluten fueron capaces de hidrolizar también la gelatina. Se comprobó que cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Paenibacillus jamilae*, *Bifidobacterium longum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Pediococcus acidilactici*, *Propionibacterium acnes* y *Stenotrophomonas maltophilia* eran capaces de hidrolizar las proteínas del gluten y la gelatina. Lo mismo ocurría con todas las cepas aisladas de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. En cambio, algunas cepas de *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus gasseri* fueron capaces de generar halo en gelatina pero no en gluten.

Tabla 4. 4: Actividades proteolíticas de las cepas bacterianas seleccionadas de los Medios MCG-1, MCG-2 y MCG-3.

Especie	Cepas	Crece MCG/ Crece MSG	Degrada Gluten	Degrada Gelatina
<i>Enterococcus faecalis</i>	A-1,A-2,A-3,A-4,A-5,A-6,A-47,A-45, A-62,A-63,A-138,HF1,HF2	+/+	++	++
<i>Enterococcus faecium</i>	A-7,A-8,A-9,A-32,A-33	+/-	-	-
	A-97	+/+	++	++
<i>Lactobacillus mucosae</i>	A-67,A-68,A-71,A1a,LB1a,D5a1	+/-	-	+
	LE1a,B1c,B2b,B3a,D2a,D2d,LD1a	+/-	-	-
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	A2c,D3b, LA1b,D1d,D4a,D5a2, E1a	+/-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	A-108	+/-	-	+/-
<i>Lactobacillus ruminis</i>	A-39,A-44	+/-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	A-17	+/-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LA2a,LE3,D1a,LA2d,LD2a,LE2a	+/-	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	A-111,A-113,A-116,A-118	+/-	++	++
<i>Streptococcus sanguinis</i>	A-105,A-101	+/-	-	-
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	A-65	+/-	-	-
<i>Streptococcus intermedius/ constellatus/anginosus</i>	A-38	+/-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	A-104,A-109,A-110	+/+	++	++
<i>Bacillus subtilis</i>	HA4,HA5	+/+	++	++
<i>Bacillus pumilus</i>	HC2,HC6,HC9	+/+	++	++
<i>Paenibacillus jamilae</i>	B4a,B4a2	+/+	++	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	A-15,A-16,A-25,A-28,A-64,A-139,A-140	+/-	-	-
	A-27,A-106	+/+	+	+
<i>Staphylococcus hominis</i>	A,36,A-42	+/-	-	-
	A-78	+/+	+	+
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	A-18,A-100,E3c	+/-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	A-43	+/-	-	-
<i>Staphylococcus pasteurii/warneri</i>	A-46	+/-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	A-47,A-58	+/-	-	-
<i>Clostridium botulinum/ sporogenes</i>	A-30,A-49,A-102,A-103,A-117, A-119,A-141	+/+	++	++
<i>Clostridium perfringens</i>	A-40,A-41,A-74,A-75 A-76,A-77	+/+	++	++
<i>Clostridium sordellii</i>	A-19,A-20,A-21,A-22	+/+	++	++
<i>Clostridium butyricum/beijerinckii</i>	A-114,A-115	+/+	++	++
<i>Corynebacterium accolens/ pseudogenitalium</i>	A-31	+/-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	A-107,A-137	+/-	++	++
<i>Bifidobacterium longum</i>	A-11,A-12,A-26,A-35,A-48,A-66, A-73,A-95,A-122,A-125,	+/-	-	-
	A-98,A-99	+/-	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	A-10,A-34,A-72	+/-	-	-
<i>Bifidobacterium catenulatum/ pseudocatenulatum</i>	A-123,A-124	+/-	-	-
<i>Bifidobacterium animalis</i>	A-120,A-121	+/-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A-81	+/-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A-80,A-96,HD1,HD2	+/-	-	-
<i>Escherichia coli/Shigella flexneri</i>	A-13,A-14,A-23,A-24,A-60,A-61	+/-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	HE1,HE2,HB1,HB3,HB9,HB18	+/-	+	+

4.5- Estudio molecular mediante PCR-DGGE de la microbiota que se desarrolla en el medio de cultivo líquido MCG-3

Sólo un pequeño porcentaje de las bacterias intestinales son aisladas por técnicas de cultivo. Por esta razón se llevó a cabo un estudio molecular, mediante PCR-DGGE, de la microbiota que se desarrolla en el medio de cultivo MCG-3. Se utilizó este medio de cultivo porque era el que estimulaba mayor actividad proteolítica microbiana cuando se inocula con muestras fecales y, además, es el medio de cultivo donde proliferaba mayor diversidad de bacterias capaces de participar en el metabolismo del gluten. Para llevar a cabo este objetivo, después de cultivar el medio MCG-3 con las muestras fecales de 7 voluntarios sanos, 5 celíacos activos y 10 familiares de pacientes celíacos, se extrajo el ADN genómico del cultivo en MCG-3 y se empleó como molde en reacciones de PCR empleando los cebadores universales HDA1GC/HDA2. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento, de unos 200 pb, correspondiente a la región V3 del ADNr 16S (Anexo 1). Seguidamente, los productos de PCR generados fueron separados mediante la técnica del DGGE en geles del 10% de acrilamida/bisacrilamida en un gradiente desnaturante del 35-55% de urea y formamida. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 70 V y a una temperatura de 60 °C, durante 15 h. Como resultado, cada muestra generó un patrón de bandas en el que cada banda, en teoría, correspondía a una especie bacteriana diferente. 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. Se obtuvo un dendograma que reflejó el agrupamiento de las comunidades de bacterias de las diferentes muestras. El dendograma se muestra en la Figura 4.3. Se analizó si las comunidades bacterianas se agrupaban en función del diagnóstico o del consumo del gluten del medio de cultivo. Sin embargo, no aparecieron diferencias significativas.

El dendograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos del DGGE para las muestras fecales cultivadas en MCG-3 no muestra un agrupamiento claro en función del diagnóstico. En la Figura 4.9 se muestra que la mayoría de pacientes celíacos (60%) quedan agrupados en el *cluster* B junto con un familiar de paciente celíaco y un sano. Los otros dos celíacos analizados se reparten de diferente manera: el paciente C-4 no se agrupa y se encuentra aislado del resto del árbol, y el paciente C-3 aparece en el *cluster* C. Este *cluster* agrupa principalmente a los voluntarios sanos junto con el *cluster* E. Los familiares de celíacos aparecen en los *clusters* A y D. Por

tanto, no aparecen diferencias importantes en el cultivo de las muestras fecales en MCG-3 a nivel de diagnóstico. Lo mismo ocurre cuando se estudia la agrupación de las muestras según el consumo de gluten, tampoco se observa una agrupación clara. No obstante la muestra analizada es muy pequeña y el número de bandas que aparecen no es muy elevado.

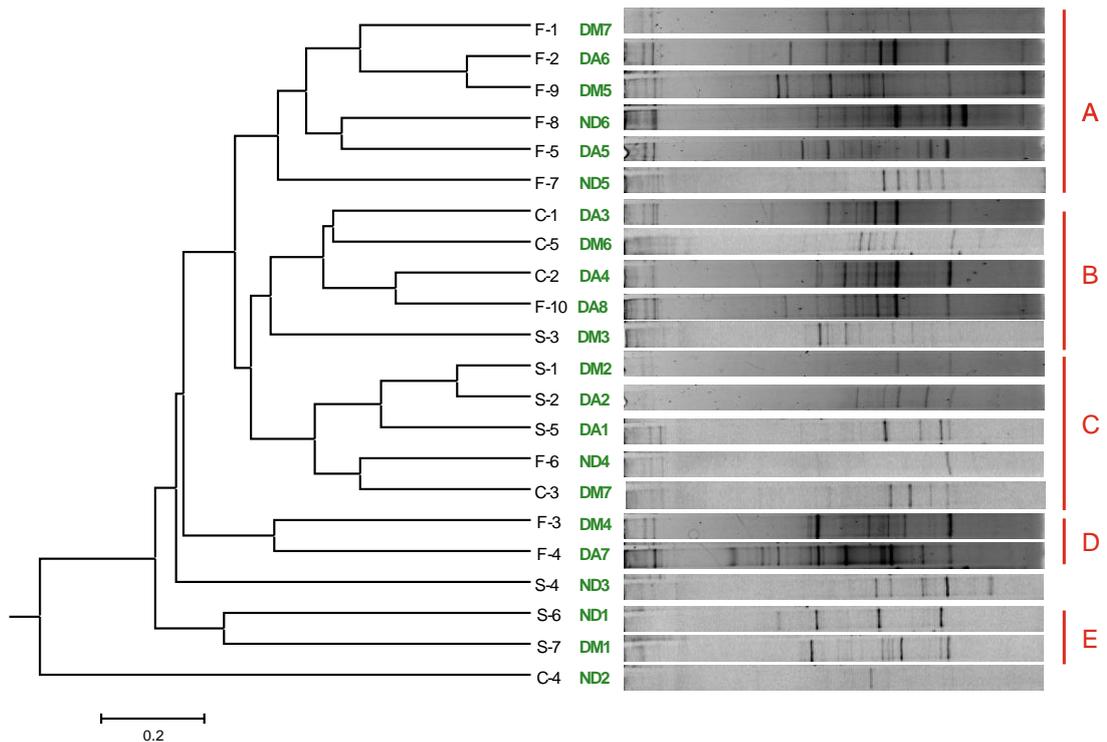


Figura 4. 4: Dendrograma derivado del análisis de los perfiles electroforéticos del DGGE para las muestras fecales de 7 voluntarios sanos, 5 celíacos activos, 7 familiares DQ+ y 3 familiares DQ- cultivadas en MCG-3. S: sano, F: familiar de celíaco, C: enfermo celíaco, ND: no degradación, DM: degradación media, DA: degradación alta.

Se seleccionaron varias bandas, generadas por la técnica PCR-DGGE, para llevar a cabo la identificación molecular de las bacterias que proliferaban en MCG-3. Las bandas seleccionadas se muestran en la Figura 4.4. Estas bandas fueron amplificadas mediante la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos HDA1/HDA2 como *primers*. Los productos de PCR fueron clonados y enviados a secuenciar al Servicio de Secuenciación de Ácidos Nucleicos de la Universidad de León. Para completar la identificación molecular de cada una de las bandas también se llevó a cabo un análisis filogenético (Anexo 3). Muchas de las bandas no se pudieron identificar a nivel de especie debido al pequeño fragmento secuenciado (200 pb). Así

mismo, se realizó un estudio comparativo entre las distintas especies bacterianas que aparecen en función del diagnóstico y del consumo de gluten de la muestra. En la Tabla 4.5 se muestra la identificación de las bandas generadas en la PCR-DGGE en función del diagnóstico.

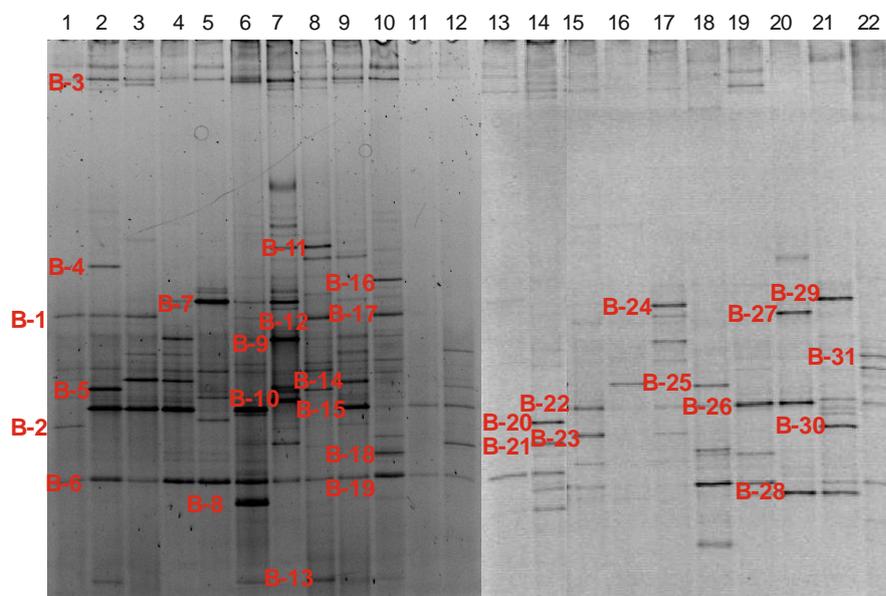


Figura 4. 5: Bandas del DGGE que fueron identificadas. B: banda seleccionada. Carriles: familiares de pacientes celíacos (1,2,5,6,7,8,9,10,13,14), sanos (11,12,17,18,19,20,21), enfermos celíacos (3,4,15,16,22).

Como se puede ver en la Tabla 4.5, el MCG-3 favorece el crecimiento de bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Las bandas generadas por PCR-DGGE del género *Lactobacillus* correspondían a 5 especies bacterianas diferentes: *L. fermentum*, *L. mucosae*, *L. ruminis*, *L. coleohominis/panis/pontis* y *L. helveticus/gallinarum/acidophilus*. En cambio, las bacterias del género *Bifidobacterium* pertenecían a *B. longum* y *B. adolescentis/ruminantium/bifidum*. Además, *Bifidobacterium longum* fue la bacteria presente en más muestras, independientemente del diagnóstico, apareciendo en un 86% de los individuos analizados. La mayoría de las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* habían sido aisladas en cultivo en medio sólido y se había demostrado su relación con el metabolismo del gluten. El resto de bandas secuenciadas de la PCR-DGGE que correspondían a bacterias aisladas mediante técnicas de cultivo, como *Enterococcus faecalis* o *Clostridium perfringens*, se había observado que

presentaban actividad proteolítica frente al gluten. Por tanto, parece que el MCG-3 es un medio idóneo para estudiar las bacterias que participan en el metabolismo del gluten. No obstante, se identificaron otras bacterias que no habían sido aisladas en el cultivo en medio sólido como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium symbiosum*, *Bacteroides dorei*, *Mitsuokella jalaludinii* y *Eubacterium bifforme*. No es posible determinar mediante esta técnica si estas bacterias están relacionadas con el metabolismo del gluten. Sin embargo, la proliferación de numerosas bacterias relacionadas con el gluten en el MCG-3 podría indicar que éstas utilizan el gluten del medio alguna manera o, por otro lado, se aprovechan de los nutrientes generados por las bacterias que si metabolizan el gluten.

Tabla 4. 5: Frecuencia de bacterias detectadas mediante PCR- DGGE en muestras fecales de individuos sanos (S), celíacos (C) y familiares de pacientes celíacos (F).

Especie bacteriana	Bandas	S	F	C
		% (n=7)	% (n=10)	% (n=5)
<i>Eubacterium hadrum/ Anaerostipes sp.</i>	B14	14,28 (1/7)	30 (3/10)	20 (1/5)
<i>Bacteroides dorei</i>	B3	57,1 (4/7)	100 (10/10)	60 (3/5)
<i>Bifidobacterium adolescentis/ B.ruminantium</i>	B12,B23	28,6 (2/7)	10 (2/10)	0 (0/7)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	B13	0 (0/7)	50 (5/10)	0 (0/7)
<i>Bifidobacterium longum</i>	B2,B6,B15,B19,B20, B22,B26,B28	71,4 (5/7)	100 (10/10)	80 (4/5)
<i>Clostridium perfringens</i>	B21	0 (0/7)	40 (4/10)	0 (0/5)
<i>Clostridium symbiosum</i>	B31	28,6 (2/7)	30 (3/10)	60 (3/5)
<i>Enterococcus faecalis</i>	B7,B9	0 (0/7)	40 (4/10)	20 (1/5)
<i>Eubacterium biforme</i>	B16	14,28 (1/7))	30 (3/10)	20 (1/5)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	B1,B24	28,6 (2/7)	60 (6/10)	20 (1/5)
<i>Lactobacillus coleohominis/ L.panis/ L.pontis</i>	B10	0 (0/7)	30 (3/10)	0 (0/5)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	B4	0 (0/7)	30 (3/10)	0 (0/5)
<i>Lactobacillus mucosae</i>	B30	14,28 (1/7)	10 (1/10)	0 (0/5)
<i>Lactobacillus ruminis</i>	B5,B25	14,3 (1/7)	30 (3/10)	20 (1/5)
<i>Lactobacillus helveticus/ L.gallinarum/ L.acidophilus</i>	B17,B29	28,6 (2/7)	60 (6/10)	20 (1/5)
<i>Mitsuokella jalaludinii</i>	B18	28,6 (2/7)	20 (2/10)	0 (0/5)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B27	28,6 (2/7)	0 (0/10)	0 (0/5)

Al analizar las diferentes especies bacterianas que aparecieron en las muestras fecales en función del diagnóstico no se detectaron cambios estadísticamente significativos. Aparecieron bacterias como *Lactobacillus coleohominis/panis/pontis* que sólo se encontraron en familiares de pacientes celíacos (30%) o bacterias como

Clostridium symbiosum que aparecían con mayor frecuencia en pacientes celíacos. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas con el análisis estadístico Chi cuadrado. Por otro lado, el número de bandas de cada individuo en cada perfil de DGGE fue considerado como un indicador de la diversidad de la microbiota capaz de crecer en MCG-3. Los familiares de pacientes celíacos fueron los voluntarios que más bandas tuvieron con una media de 8,35 bandas. En cambio, los celíacos (media 5,2) y los sanos (media 5,14) presentaban menor número de bandas. Sin embargo estas diferencias no fueron significativas al aplicar el test U de Mann-Whitney. El mismo análisis se llevó a cabo en función del consumo de gluten de cada muestra fecal. No se relacionó ninguna bacteria con una mayor actividad degradadora de gluten (resultados no mostrados).

La técnica de la PCR-DGGE permite el estudio de la microbiota fecal capaz de proliferar en MCG-3. Sin embargo, no permite conocer la posible relación entre las bacterias y el metabolismo del gluten. La mayoría de las bacterias identificadas mediante esta técnica habían sido aisladas en MCG-3 sólido y se había mostrado que necesitaban el gluten para crecer. Por tanto, parece que el MCG-3 es un buen medio de cultivo para estudiar las bacterias fecales que participan en el metabolismo del gluten. Sin embargo, tras la secuenciación de las bandas generadas por la PCR-DGGE, se han identificado bacterias, no aisladas mediante técnicas de cultivo en el medio sólido, que se desconoce si participan o no en el metabolismo del gluten. Este es el caso de *Lactobacillus coleohominis/panis/pontis* o *Lactobacillus helveticus/gallinarum/acidophilus*. Salvo estas bacterias, el resto de especies de *Lactobacillus* identificadas habían sido aisladas en cultivo en medio sólido y se había demostrado una relación con el metabolismo del gluten. Además, se han descrito cepas bacterianas de *Lactobacillus*, con actividad hidrolítica frente a las proteínas del gluten, que podrían tener interés como probióticos o en la industria alimentaria (93, 94). Precisamente, *Lactobacillus helveticus* es una especie bacteriana que presenta diversas actividades enzimáticas, como la actividad PEP (257, 293, 294). Por tanto, parece factible que las cepas de *Lactobacillus* identificadas molecularmente mediante la técnica de la PCR-DGGE participen en el metabolismo del gluten. Más complicado es determinar si bacterias como *Mitsuokella jalaludinii*, *Clostridium symbiosum*, *Bacteroides dorei*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Streptococcus agalactiae* y *Eubacterium* participan en el metabolismo del gluten. Las bacterias de los géneros *Bacteroides* y *Clostridium* presentan diversas actividades proteolíticas (207, 223, 295). En el apartado anterior hemos visto que las cepas de *Clostridium* aisladas presentaban actividad proteolítica frente al gluten. Además, Sánchez E *et al.* (237)

mostraron que cepas de *Bacteroides fragilis* eran capaces de degradar gliadinas. Por tanto, las bacterias identificadas como *Bacteroides dorei* o *Clostridium symbiosum* podrían utilizar el gluten del medio. Lo mismo puede ocurrir con *Streptococcus agalactiae*, ya que se han aislado, en el apartado anterior, varias cepas bacterianas de *Streptococcus* que necesitaban gluten para crecer. Además, cepas de *Streptococcus* relacionadas con el metabolismo del gluten han sido aisladas previamente de la cavidad oral y del duodeno (136, 234). Por otro lado, no existen referencias bibliográficas que describan una actividad proteolítica frente al gluten de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Mitsuokella jalaludinii* y *Eubacterium*. Sin embargo, si se ha descrito que *Faecalibacterium prausnitzii* es una bacteria intestinal que aparece disminuida en las heces de voluntarios sanos llevando a cabo una DSG (236). Por tanto, parece posible la relación de *Faecalibacterium prausnitzii* con el metabolismo del gluten. En cambio, aunque *Eubacterium* y *Mitsuokella* son grupos bacterianos que coloniza el intestino grueso, no se puede determinar si existe una relación con el metabolismo del gluten intestinal.

4.6- Discusión general

Los microorganismos que viven en el tracto digestivo interactúan con el hospedador ejerciendo una influencia vital en el correcto desarrollo bioquímico y fisiológico del organismo que colonizan (219). Una de las funciones más importantes de la microbiota intestinal es el metabolismo de compuestos no digeribles por las enzimas digestivas humanas. Los microorganismos producen diversas enzimas y rutas bioquímicas, distintas a las que se encuentran en el huésped, permitiendo así el aprovechamiento de alimentos ingeridos en la dieta que no podrían ser utilizados por las células del hospedador (231). Se ha demostrado que las bacterias del intestino participan activamente en el metabolismo de carbohidratos resistentes a la digestión humana (219). Sin embargo, se desconoce el papel de la microbiota intestinal en el metabolismo de las proteínas.

La ingesta de gluten en una dieta occidental es elevada. Aunque se considera que la digestión de los compuestos proteicos comienza en el estómago, un estudio reciente ha descrito una actividad proteolítica de origen bacteriano en la cavidad oral. Esta actividad proteolítica es capaz de hidrolizar péptidos ricos en prolina como los que aparecen en las proteínas del gluten. Precisamente, la actividad proteolítica oral es capaz de hidrolizar péptidos resistentes a las enzimas digestivas humanas como el péptido 33-mer (135). Dentro de las bacterias orales que generaban esta actividad se

identificó a *Rothia mucilaginosa* y *Rothia aeria*, las cuales eran capaces de digerir eficientemente las proteínas del gluten. Además, se mostró que las enzimas de *Rothia aeria* eran capaces de resistir las condiciones ácidas del estómago y reactivarse en el intestino delgado (136). Curiosamente, especies de *Rothia* han sido también descritas en el duodeno donde podrían hidrolizar las proteínas del gluten (89). Otras bacterias relacionadas con el metabolismo del gluten en la cavidad oral fueron *Streptococcus mitis*, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bifidobacterium longum*, y *B. dentium* (136). Por tanto, la digestión del gluten puede comenzar en la cavidad oral gracias las bacterias proteolíticas de la placa dental.

El principal proceso digestivo de las proteínas tiene lugar en el duodeno. Los componentes de origen proteico ingeridos en la dieta, como las prolaminas del gluten, son digeridos en productos de menor tamaño al llegar al duodeno. Esta función la llevan a cabo las enzimas pancreáticas y del cepillo intestinal generando compuestos fácilmente absorbibles por los enterocitos (22). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que las prolaminas del gluten son resistentes a las enzimas digestivas humanas (137). La hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que participan residuos de prolina se produce, entre otras, por la actividad prolilendopeptidásica. Las enzimas proteolíticas humanas presentes en el tubo digestivo carecen de esta actividad (24, 25, 141). Por tanto, péptidos relativamente grandes, ricos en prolina y glutamina, permanecen en el intestino delgado humano y pueden convertirse en sustrato de las bacterias duodenales. Aunque hay una menor diversidad microbiana en el intestino delgado con respecto al intestino grueso, la elevada concentración de proteínas en el lumen puede hacer que proliferen bacterias proteolíticas (122). De hecho se han descrito proteasas microbianas capaces de hidrolizar gluten en la mucosa duodenal. Sin embargo estas proteasas sólo se han observado en pacientes con EC (142). En un estudio reciente se han aislado bacterias duodenales capaces de crecer en medios con gluten como única fuente de nitrógeno. La mayoría de las bacterias aisladas pertenecían al género *Streptococcus*. Además, también aparecieron especies como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis* con actividad proteolítica frente al gluten (234). Por tanto, la microbiota duodenal podría tener un papel importante en el metabolismo del gluten. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que en el intestino de humanos aparecen bacterias proteolíticas capaces de participar en el metabolismo del gluten. Aunque estas bacterias se han aislado de muestras fecales, por lo que es más probable que procedan del intestino grueso, no se puede descartar que alguna de las cepas forme parte de la microbiota duodenal, participando

activamente en el metabolismo del gluten. De hecho, se ha descrito que la microbiota fecal puede reflejar en parte la composición de la microbiota del intestino delgado (86).

La resistencia de las proteínas del gluten a las enzimas digestivas humanas permite la llegada de gluten parcialmente digerido al intestino grueso donde hay una extensa y compleja microbiota (144). En esta Tesis Doctoral se ha descrito una intensa actividad glutenásica fecal. Además, las muestras de heces eran capaces de hidrolizar péptidos resistentes a las enzimas digestivas humanas, como el péptido 33-mer. En base a estos resultados, se especuló que las proteasas bacterianas podrían llevar a cabo la digestión de los péptidos resistentes del gluten. Precisamente, en este Capítulo se muestra que el cultivo de las muestras fecales en los medios MCG era capaz de eliminar, en mayor o menor medida, el contenido de gluten del medio. Estudios previos han mostrado que bacterias del grupo de las bifidobacterias, así como del género *Bacteroides*, podrían hidrolizar péptidos del gluten en el intestino grueso (110, 145, 146). En esta Tesis Doctoral se han descrito un total de 144 cepas bacterianas relacionadas con el metabolismo del gluten, que pertenecen a 35 especies bacterianas diferentes. La mayoría de las bacterias aisladas corresponden a los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. Además, se mostró que cepas bacterianas de *Bacillus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Pediococcus* presentaban actividad proteolítica frente al gluten. Se ha observado que alguna de estas bacterias son capaces de hidrolizar péptidos resistentes a las enzimas digestivas humanas pudiendo generar compuestos fácilmente absorbibles por el hospedador (resultados no mostrados). Sin embargo, estos compuestos proteicos generados en el intestino grueso no pueden ser aprovechados por el hospedador porque, en condiciones normales, el tracto bajo del intestino parece que no es capaz de absorber aminoácidos, dipéptidos ni tripéptidos. De modo que estos compuestos quedan principalmente para el metabolismo bacteriano o son excretados por las heces.

Por otro lado, las bacterias aisladas en esta Tesis Doctoral también pueden tener gran importancia en el tratamiento de la EC. Actualmente, el único tratamiento aceptado para la EC es una dieta completamente libre de gluten (17). En la mayoría de los pacientes, el cumplimiento estricto de la DSG conduce, en pocos meses, a la recuperación de la mucosa del intestino delgado (34). Sin embargo, la eliminación del gluten ingerido en la dieta es realmente complicada; además, este tratamiento puede tener un impacto negativo en la calidad de vida del paciente (10). Por tanto, aunque una dieta libre de gluten es segura y efectiva para la mayoría de los pacientes celíacos, la presencia de estas complicaciones hace necesaria la aparición de

tratamientos innovadores para la EC (10). El uso de microorganismos y proteasas bacterianas puede ser una de las alternativas para el tratamiento de la EC. Se han descrito cepas bacterianas capaces de reducir las fracciones inmunogénicas del gluten durante el pretratamiento de la masa madre en la elaboración del pan (92) y se ha propuesto el uso de proteasas bacterianas en la terapia enzimática oral, que consiste en la actuación de enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar el gluten en la parte alta del tracto digestivo (67). Además, el uso de bacterias probióticas con la capacidad de atenuar el proceso inflamatorio que generan los péptidos del gluten en pacientes celíacos también es de interés (296). El cuerpo humano, y más concretamente el tracto gastrointestinal, es un enorme reservorio de microorganismos cuya contribución a la salud y al bienestar humano, incluyendo aspectos digestivos, es cada día más reconocida (136). En esta Tesis Doctoral se han aislado varias cepas bacterianas capaces de hidrolizar el gluten y que pueden tener un alto interés biotecnológico para el tratamiento de la EC. Precisamente, cepas proteolíticas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, como las que se aislaron en MCG, se están empezando a utilizar actualmente (92-94, 109, 110). No obstante, el uso de estas bacterias está supeditado a muchos factores como: la aparición de genes de virulencia, la capacidad de hidrolizar péptidos tóxicos del gluten o la funcionalidad en el tracto digestivo humano. Por tanto, el uso de las bacterias fecales en el tratamiento de la EC requiere un estudio exhaustivo e individualizado de cada bacteria.

CONCLUSIONES

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue el estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en humanos. De los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir:

1- Existe una correlación entre la ingesta de gluten en la dieta, algunas actividades proteolíticas intestinales y el gluten excretado por las heces.

2- En el intestino humano aparecen actividades proteolíticas diferentes a las que generan las enzimas digestivas humanas. Pese a ello, el gluten no se digiere completamente en el tracto gastrointestinal y se excreta en las heces.

3- Los pacientes celíacos parecen mostrar un metabolismo del gluten alterado que se refleja en un incremento de actividades proteolíticas intestinales, en un desequilibrio en los AGCC y en una reducción del gluten excretado por las heces.

4- Los pacientes celíacos y los familiares de pacientes celíacos presentan una actividad metabólica microbiana similar, que difiere a la que se obtiene en voluntarios sanos, como refleja la excreción de los AGCC fecales

5- En el tubo digestivo humano hay una gran diversidad de especies bacterianas con capacidad para participar en el metabolismo del gluten.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot.* 2002;53(370):947-58.
2. Shewry PR. Wheat. *J Exp Bot.* 2009;60(6):1537-53.
3. Belderok B. Developments in bread-making processes. *Plant Foods Hum Nutr.* 2000;55(1):1-86.
4. Fasano A. Surprises from celiac disease. *Sci Am.* 2009;301(2):54-61.
5. Tosi P, Gritsch CS, He J, Shewry PR. Distribution of gluten proteins in bread wheat (*Triticum aestivum*) grain. *Ann Bot.* 2011;108(1):23-35.
6. Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357(1418):133-42.
7. van Overbeek FM, Uil-Dieterman IG, Mol IW, Köhler-Brands L, Heymans HS, Mulder CJ. The daily gluten intake in relatives of patients with coeliac disease compared with that of the general Dutch population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997;9(11):1097-9.
8. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007;24(2):115-9.
9. Osborne TB. The vegetable proteins. 2nd ed. London: Longmans; 1924.
10. Caputo I, Lepretti M, Martucciello S, Esposito C. Enzymatic strategies to detoxify gluten: implications for celiac disease. *Enzyme Res.* 2010;2010:174354.
11. Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl.* 1996;412:3-9.
12. Köhler P, Belitz HD, Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten: isolation of a cystine peptide from glutenin. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1991;192(3):234-9.
13. Wellner N, Marsh JT, Savage AW, Halford NG, Shewry PR, Clare Mills EN, et al. Comparison of repetitive sequences derived from high molecular weight subunits of wheat glutenin, an elastomeric plant protein. *Biomacromolecules.* 2006;7(4):1096-103.
14. Keck B, Köhler P, Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten: cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1995;200(6):432-9.
15. Shewry PR, Tatham AS. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem J.* 1990;267(1):1-12.
16. Miles MJ, Carr HJ, McMaster TC, l'Anson KJ, Belton PS, Morris VJ, et al. Scanning tunneling microscopy of a wheat seed storage protein reveals details of an unusual supersecondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(1):68-71.
17. Hamer RJ. Coeliac Disease: background and biochemical aspects. *Biotechnol Adv.* 2005;23(6):401-8.
18. Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ, Shewry PR. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(5):379-407.
19. Shewry PR, Halford NG, Lafiandra D. Genetics of wheat gluten proteins. *Adv Genet.* 2003;49:111-84.
20. Comino I, Real A, de Lorenzo L, Cornell H, López-Casado M, Barro F, et al. Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut.* 2011;60(7):915-22.
21. Tatham AS, Shewry PR. Allergens to wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(11):1712-26.
22. Ganapathy V, Gupta N, Martindale RG. Protein digestion and absorption. *Physiology of the gastrointestinal tract.* Fourth ed. San Diego 2006. p. 1667-92.
23. Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, et al. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res.* 2005;4(5):1732-41.

24. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283(4):G996-G1003.
25. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002;297(5590):2275-9.
26. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003;362(9377):30-7.
27. Green P, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1731-43.
28. Camarca A, Del Mastro A, Gianfrani C. Repertoire of gluten peptides active in celiac disease patients: perspectives for translational therapeutic applications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012;12(2):207-19.
29. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AV. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med*. 2000;6(3):337-42.
30. Qiao SW, Sollid LM, Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(1):111-7.
31. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2012.
32. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(1):1-19.
33. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid L. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(3):373-87.
34. da Silva Neves MM, González-García MB, Nouws HP, Delerue-Matos C, Santos-Silva A, Costa-García A. Celiac disease diagnosis and gluten-free food analytical control. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(5):1743-53.
35. Talley NJ, Valdovinos M, Petterson TM, Carpenter HA, Melton LJ. Epidemiology of celiac sprue: a community-based study. *Am J Gastroenterol*. 1994;89(6):843-6.
36. Setty M, Hormaza L, Guandalini S. Celiac disease: risk assessment, diagnosis, and monitoring. *Mol Diagn Ther*. 2008;12(5):289-98.
37. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*. 2001;120(3):636-51.
38. Reilly NR, Green PH. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):473-8.
39. Vivas S, Ruiz de Morales JM, Fernandez M, Hernando M, Herrero B, Casqueiro J, et al. Age-related clinical, serological, and histopathological features of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(9):2360-5; quiz 6.
40. Ciclitira PJ, King AL, Fraser JS. AGA technical review on Celiac Sprue. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1526-40.
41. Dowd B, Walker-Smith J. Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection. *Br Med J*. 1974;2(5909):45-7.
42. Losowsky MS. A history of coeliac disease. *Dig Dis*. 2008;26(2):112-20.
43. Dicke WK, Weijers HA, Van de Kamer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr*. 1953;42(1):34-42.
44. Paulley JW. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J*. 1954;2(4900):1318-21.
45. Sakula J, Shiner M. Coeliac disease with atrophy of the small-intestine mucosa. *Lancet*. 1957;273(7001):876-7.
46. Kagnoff M. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*. 2007;117(1):41-9.

47. Trier JS. Diagnosis of celiac sprue. *Gastroenterology*. 1998;115(1):211-6.
48. Troncone R, Ivarsson A, Szajewska H, Mearin ML, (CDEUSSA) MoEMPoC. Review article: future research on coeliac disease - a position report from the European multistakeholder platform on coeliac disease (CDEUSSA). *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(11):1030-43.
49. van Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. *Gut*. 2006;55(7):1037-46.
50. Riordan FA, Davidson DC. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease and medical audit. *Arch Dis Child*. 1991;66(4):561.
51. Freeman HJ. Adult celiac disease and the severe "flat" small bowel biopsy lesion. *Dig Dis Sci*. 2004;49(4):535-45.
52. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease--active, silent, latent, potential. *Gut*. 1993;34(2):150-1.
53. Wahnschaffe U, Ullrich R, Riecken EO, Schulzke JD. Celiac disease-like abnormalities in a subgroup of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1329-38.
54. Holmes GK. Potential and latent coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(9):1057-60.
55. Chegade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(1):3-12; quiz 3.
56. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005;206:232-59.
57. Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol*. 1996;157(4):1406-14.
58. Arranz E, Garrote JA. [Immunology of celiac disease]. *Gastroenterol Hepatol*. 2010;33(9):643-51.
59. Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quarantino S, Maiuri L. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol*. 2005;42(8):913-8.
60. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3(9):516-25.
61. Bernardo D. Interacciones innato-adaptativas en el sistema inmune y su relación con la patogenia de la enfermedad celíaca. Tesis Doctoral, Valladolid: Universidad de Valladolid; 2008.
62. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002;50(5):624-8.
63. Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*. 2006;55(6):803-8.
64. Högborg L, Fälth-Magnusson K, Grodzinsky E, Stenhammar L. Familial prevalence of coeliac disease: a twenty-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38(1):61-5.
65. Greco L, Troncone R. Coeliac families. *Acta Paediatr*. 2002;91(1):16-7.
66. Hill PG, McMillan SA. Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. *Ann Clin Biochem*. 2006;43(Pt 2):105-17.
67. McAllister CS, Kagnoff MF. The immunopathogenesis of celiac disease reveals possible therapies beyond the gluten-free diet. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):581-600.
68. King AL, Ciclitira PJ. Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2):70-5.
69. Hunt KA, van Heel DA. Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut*. 2009;58(4):473-6.
70. van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(3):323-39.
71. Van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, Bardoel AF, Mulder CJ, Pearson PL, et al. A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1032-41.
72. Sanz Y, De Pama G, Laparra M. Unraveling the ties between celiac disease and intestinal microbiota. *Int Rev Immunol*. 2011;30(4):207-18.

73. Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr.* 2000;89(2):165-71.
74. Myléus A, Ivarsson A, Webb C, Danielsson L, Hernell O, Högberg L, et al. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(2):170-6.
75. Ivarsson A. The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach--some lessons to be learnt. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19(3):425-40.
76. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(5):914-21.
77. Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child.* 2006;91(1):39-43.
78. Hanson LA, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin Neonatol.* 2002;7(4):275-81.
79. Hanson LA, Korotkova M, Telemo E. Breast-feeding, infant formulas, and the immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;90(6 Suppl 3):59-63.
80. Plot L, Amital H. Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev.* 2009;8(4):316-9.
81. Kagnoff MF, Austin RK, Hubert JJ, Bernardin JE, Kasarda DD. Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J Exp Med.* 1984;160(5):1544-57.
82. Nieuwenhuizen WF, Pieters RH, Knippels LM, Jansen MC, Koppelman SJ. Is *Candida albicans* a trigger in the onset of coeliac disease? *Lancet.* 2003;361(9375):2152-4.
83. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(10):2333-40.
84. Forsberg G, Fahlgren A, Hörstedt P, Hammarström S, Hernell O, Hammarström ML. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(5):894-904.
85. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2009;62(3):264-9.
86. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol.* 2008;8:232.
87. Collado MC, Calabuig M, Sanz Y. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2007;8(1):9-14.
88. Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 12):1669-74.
89. Nistal E, Caminero A, Herrán AR, Arias L, Vivas S, de Morales JM, et al. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(4):649-56.
90. Chand N, Mihas AA. Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(1):3-14.
91. Kupper C. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology.* 2005;128(4 Suppl 1):S121-7.
92. Di Cagno R, Barbato M, Di Camillo C, Rizzello CG, De Angelis M, Giuliani G, et al. Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(6):777-83.
93. Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, et al. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(14):4499-507.

94. De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, et al. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(1):80-93.
95. Gianfrani C, Siciliano RA, Facchiano AM, Camarca A, Mazzeo MF, Costantini S, et al. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007;133(3):780-9.
96. Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J*. 2004;383(Pt 2):311-8.
97. Tennyson CA, Lewis SK, Green PH. New and developing therapies for celiac disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009;2(5):303-9.
98. Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A, Khosla C. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*. 2007;133(2):472-80.
99. Siegel M, Garber ME, Spencer AG, Botwick W, Kumar P, Williams RN, et al. Safety, tolerability, and activity of ALV003: results from two phase 1 single, escalating-dose clinical trials. *Dig Dis Sci*. 2012;57(2):440-50.
100. Tye-Din JA, Anderson RP, Ffrench RA, Brown GJ, Hodsman P, Siegel M, et al. The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune response and symptoms in celiac disease in vivo. *Clin Immunol*. 2010;134(3):289-95.
101. Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, et al. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(4):G621-9.
102. Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L, Koning F. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. 2008;57(1):25-32.
103. Pinier M, Verdu EF, Nasser-Eddine M, David CS, Vézina A, Rivard N, et al. Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium. *Gastroenterology*. 2009;136(1):288-98.
104. Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray JA, David CS, et al. The copolymer P(HEMA-co-SS) binds gluten and reduces immune response in gluten-sensitized mice and human tissues. *Gastroenterology*. 2012;142(2):316-25.e1-12.
105. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 24:4435-40.
106. Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(5):757-66.
107. Sollid LM, Khosla C. Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med*. 2011;269(6):604-13.
108. Larché M, Wraith DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med*. 2005;11(4 Suppl):S69-76.
109. Medina M, De Palma G, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Bifidobacterium* strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. *J Inflamm (Lond)*. 2008;5:19.
110. Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PLoS One*. 2012;7(2):e30744.
111. Cinova J, De Palma G, Stepankova R, Kofronova O, Kverka M, Sanz Y, et al. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *PLoS One*. 2011;6(1):e16169.
112. Huijbregtse IL, Marietta EV, Rashtak S, Koning F, Rottiers P, David CS, et al. Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* delivered

immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic Abo Dq8 transgenic mice. *J Immunol.* 2009;183(4):2390-6.

113. D'Arienzo R, Maurano F, Luongo D, Mazzarella G, Stefanile R, Troncone R, et al. Adjuvant effect of *Lactobacillus casei* in a mouse model of gluten sensitivity. *Immunol Lett.* 2008;119(1-2):78-83.

114. Gass J, Vora H, Hofmann AF, Gray GM, Khosla C. Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids. *Gastroenterology.* 2007;133(1):16-23.

115. Roberts NB. Review article: human pepsins - their multiplicity, function and role in reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24 Suppl 2:2-9.

116. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci.* 2007;52(1):1-17.

117. Nixon SE, Mawer GE. The digestion and absorption of protein in man. 2. The form in which digested protein is absorbed. *Br J Nutr.* 1970;24(1):241-58.

118. Leibach FH, Ganapathy V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr.* 1996;16:99-119.

119. Adibi SA, Mercer DW. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J Clin Invest.* 1973;52(7):1586-94.

120. Evenepoel P, Geypens B, Rutgeerts P, Ghoois Y. Study of protein assimilation, using stable isotope techniques. *Rev Med Univ Navarra.* 1998;42(2):104-8.

121. Evenepoel P, Claus D, Geypens B, Hiele M, Geboes K, Rutgeerts P, et al. Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *Am J Physiol.* 1999;277(5 Pt 1):G935-43.

122. Davila AM, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti PH, Sanz Y, et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res.* 2012.

123. Matthews DM, Crampton RF, Lis MT. Sites of maximal intestinal absorptive capacity for amino acids and peptides: evidence for an independent peptide uptake system or systems. *J Clin Pathol.* 1971;24(9):882-3.

124. Robinson JW, Luisier AL, Mirkovitch V. Transport of amino-acids and sugars by the dog colonic mucosa. *Pflugers Arch.* 1973;345(4):317-26.

125. Hanson PJ, Parsons S. Metabolism and transport of glutamine and glucose in vascularly perfused small intestine rat. *Biochem J.* 1977;166(3):509-19.

126. Ardawi MS. The transport of glutamine and alanine into rat colonocytes. *Biochem J.* 1986;238(1):131-5.

127. Calonge ML, Ilundáin A, Bolufer J. Glycylsarcosine transport by epithelial cells isolated from chicken proximal cecum and rectum. *Am J Physiol.* 1990;258(5 Pt 1):G660-4.

128. Sepúlveda FV, Smith MW. Different mechanisms for neutral amino acid uptake by newborn pig colon. *J Physiol.* 1979;286:479-90.

129. Merlin D, Si-Tahar M, Sitaraman SV, Eastburn K, Williams I, Liu X, et al. Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterology.* 2001;120(7):1666-79.

130. Ziegler TR, Fernández-Estívariz C, Gu LH, Bazargan N, Umeakunne K, Wallace TM, et al. Distribution of the H⁺/peptide transporter PepT1 in human intestine: up-regulated expression in the colonic mucosa of patients with short-bowel syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(5):922-30.

131. Cheeseman C. Role of intestinal basolateral membrane in absorption of nutrients. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):R482-8.

132. Prockop DJ, Keiser HR, Sjoerdsma A. Gastrointestinal absorption and renal excretion of hydroxyproline peptides. *Lancet.* 1962;2(7255):527-8.

133. Bronstein HD, Haeffner LJ, Kowlessar OD. The significance of gelatin tolerance in malabsorptive states. *Gastroenterology.* 1966;50(5):621-30.

134. Terada T, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui K. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 1):G1435-41.
135. Helmerhorst EJ, Zamakhchari M, Schuppan D, Oppenheim FG. Discovery of a novel and rich source of gluten-degrading microbial enzymes in the oral cavity. *PLoS One.* 2010;5(10):e13264.
136. Zamakhchari M, Wei G, Dewhirst F, Lee J, Schuppan D, Oppenheim FG, et al. Identification of *Rothia* bacteria as gluten-degrading natural colonizers of the upper gastrointestinal tract. *PLoS One.* 2011;6(9):e24455.
137. Frazer AC, Fletcher RF, Ross CA, Shaw B, Sammons HG, Schneider R. Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. *Lancet.* 1959;2(7097):252-5.
138. Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, et al. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology.* 2003;125(3):696-707.
139. Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, et al. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology.* 2005;129(3):786-96.
140. Robic S, Linscott KB, Aseem M, Humphreys EA, McCartha SR. Bile acids as modulators of enzyme activity and stability. *Protein J.* 2011;30(8):539-45.
141. Tiruppathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 1):G81-9.
142. Bernardo D, Garrote JA, Nadal I, Leon AJ, Calvo C, Fernandez-Salazar L, et al. Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa. *Gut.* 2009;58(6):886-7.
143. Comino I, Real A, Vivas S, Síglez M, Caminero A, Nistal E, et al. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(3):670-7.
144. Macfarlane GT, Allison C, Gibson SA, Cummings JH. Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J Appl Bacteriol.* 1988;64(1):37-46.
145. Sánchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal Bacteroides species associated with coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2010;63(12):1105-11.
146. Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem.* 2010;109(4):801-7.
147. Ganapathy V, Miyamoto Y, Leibach FH. Driving force for peptide transport in mammalian intestine and kidney. *Beitr Infusionther Klin Ernähr.* 1987;17:54-68.
148. Wilson D, Barry JA, Ramaswamy K. Characteristics of tripeptide transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1989;986(1):123-9.
149. Smithson KW, Gray GM. Intestinal assimilation of a tetrapeptide in the rat. Obligate function of brush border aminopeptidase. *J Clin Invest.* 1977;60(3):665-74.
150. Garcia-Horsman JA, Venäläinen JI, Lohi O, Auriola IS, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, et al. Deficient activity of mammalian prolyl oligopeptidase on the immunoactive peptide digestion in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(5):562-71.
151. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut.* 2012;61(9):1355-64.
152. Gardner ML. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annu Rev Nutr.* 1988;8:329-50.
153. Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol.* 1981;241(4):G275-88.
154. Ménard S, Lebreton C, Schumann M, Matysiak-Budnik T, Dugave C, Bouhnik Y, et al. Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *Am J Pathol.* 2012;180(2):608-15.

155. Carchon H, Serrus M, Eggermont E. Digestion of gliadin peptides by intestinal mucosa from control or coeliac children. *Digestion*. 1979;19(1):1-5.
156. Douglas AP, Booth CC. Digestion of gluten peptides by normal human jejunal mucosa and by mucosa from patients with adult coeliac disease. *Clin Sci*. 1970;38(1):11-25.
157. Bruce G, Woodley JF, Swan CH. Breakdown of gliadin peptides by intestinal brush borders from coeliac patients. *Gut*. 1984;25(9):919-24.
158. Sjöström H, Norén O, Krasilnikoff PA, Gudmand-Høyer E. Intestinal peptidases and sucrase in coeliac disease. *Clin Chim Acta*. 1981;109(1):53-8.
159. Douglas AP, Peters TJ. Peptide hydrolase activity of human intestinal mucosa in adult coeliac disease. *Gut*. 1970;11(1):15-7.
160. Houlston RS, Tomlinson IP, Ford D, Seal S, Marossy AM, Ferguson A, et al. Linkage analysis of candidate regions for coeliac disease genes. *Hum Mol Genet*. 1997;6(8):1335-9.
161. Zhong F, McCombs CC, Olson JM, Elston RC, Stevens FM, McCarthy CF, et al. An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western counties of Ireland. *Nat Genet*. 1996;14(3):329-33.
162. Clot F, Babron MC, Percopo S, Giordano M, Bouguerra F, Clerget-Darpoux F, et al. Study of two ectopeptidases in the susceptibility to celiac disease: two newly identified polymorphisms of dipeptidylpeptidase IV. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30(4):464-6.
163. Cornell HJ, Auricchio RS, De Ritis G, De Vincenzi M, Maiuri L, Raia V, et al. Intestinal mucosa of celiacs in remission is unable to abolish toxicity of gliadin peptides on in vitro developing fetal rat intestine and cultured atrophic celiac mucosa. *Pediatr Res*. 1988;24(2):233-7.
164. Cornell HJ. Mucosal digestion studies of whole gliadin fractions in coeliac disease. *Ann Clin Biochem*. 1990;27 (Pt 1):44-9.
165. Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, et al. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(12):2784-8.
166. Cobden I, Dickinson RJ, Rothwell J, Axon AT. Intestinal permeability assessed by excretion ratios of two molecules: results in coeliac disease. *Br Med J*. 1978;2(6144):1060.
167. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*. 1995;108(5):1566-81.
168. Bethune MT, Ribka E, Khosla C, Sestak K. Transepithelial transport and enzymatic detoxification of gluten in gluten-sensitive rhesus macaques. *PLoS One*. 2008;3(3):e1857.
169. Friis S, Dabelsteen E, Sjöström H, Norén O, Jarnum S. Gliadin uptake in human enterocytes. Differences between coeliac patients in remission and control individuals. *Gut*. 1992;33(11):1487-92.
170. Mazumdar K, Alvarez X, Borda JT, Dufour J, Martin E, Bethune MT, et al. Visualization of transepithelial passage of the immunogenic 33-residue peptide from alpha-2 gliadin in gluten-sensitive macaques. *PLoS One*. 2010;5(4):e10228.
171. Schulzke JD, Schulzke I, Fromm M, Riecken EO. Epithelial barrier and ion transport in coeliac sprue: electrical measurements on intestinal aspiration biopsy specimens. *Gut*. 1995;37(6):777-82.
172. Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res*. 1998;43(4 Pt 1):435-41.
173. Montalto M, Cuoco L, Ricci R, Maggiano N, Vecchio FM, Gasbarrini G. Immunohistochemical analysis of ZO-1 in the duodenal mucosa of patients with untreated and treated celiac disease. *Digestion*. 2002;65(4):227-33.
174. Szakál DN, Gyorffy H, Arató A, Cseh A, Molnár K, Papp M, et al. Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease. *Virchows Arch*. 2010;456(3):245-50.

175. Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet.* 2008;40(4):395-402.
176. Wapenaar MC, Monsuur AJ, van Bodegraven AA, Weersma RK, Bevova MR, Linskens RK, et al. Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2008;57(4):463-7.
177. Fasano A, Baudry B, Pumplun DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(12):5242-6.
178. Di Pierro M, Lu R, Uzzau S, Wang W, Margaretten K, Pazzani C, et al. Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J Biol Chem.* 2001;276(22):19160-5.
179. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 2008;57(6):747-54.
180. Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, et al. Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut.* 2010;59(3):300-10.
181. Zimmer KP, Poremba C, Weber P, Ciclitira PJ, Harms E. Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes. *Gut.* 1995;36(5):703-9.
182. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 2008;205(1):143-54.
183. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, et al. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med.* 2001;194(4):417-25.
184. Yu LC. Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. *J Allergy (Cairo).* 2012;2012:596081.
185. Wolters VM, Alizadeh BZ, Weijerman ME, Zhernakova A, van Hoogstraten IM, Mearin ML, et al. Intestinal barrier gene variants may not explain the increased levels of antigliadin antibodies, suggesting other mechanisms than altered permeability. *Hum Immunol.* 2010;71(4):392-6.
186. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 2009;136(1):65-80.
187. Guarner F, Malagelada JR. [Bacterial flora of the digestive tract]. *Gastroenterol Hepatol.* 2003;26 Suppl 1:1-5.
188. Cotter PD. Small intestine and microbiota. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27(2):99-105.
189. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308(5728):1635-8.
190. Sanz Y. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(6 Suppl):2000S-5S.
191. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(3):732-7.
192. Rastall RA. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr.* 2004;134(8 Suppl):2022S-6S.
193. Guamer F. [Role of intestinal flora in health and disease]. *Nutr Hosp.* 2007;22 Suppl 2:14-9.
194. Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2011;309(2):119-27.
195. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(4):516-20.
196. Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwiertz A, Klosterhalfen S, Frick JS. The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults. *Z Gastroenterol.* 2009;47(7):653-8.

197. Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res.* 2010;61(3):219-25.
198. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4250-5.
199. Dorer MS, Talarico S, Salama NR. *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000544.
200. Ciortescu I, Stan M. [*Helicobacter pylori*--friend or foe?]. *Rev Med Chir Soc Med Nat lasi.* 2010;114(3):619-24.
201. Shiner M, Waters TE, Gray JD. Culture Studies of the Gastrointestinal Tract with a Newly Devised Capsule. Results of Tests in Vitro and in Vivo. *Gastroenterology.* 1963;45:625-32.
202. Omoike IU, Abiodun PO. Upper small intestinal microflora in diarrhea and malnutrition in Nigerian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1989;9(3):314-21.
203. Wilson M. small intestine. Microbial inhabitants of humans their ecology and role in health and disease. New York: Cambridge university press; 2005. p. 284-94.
204. Wang X, Heazlewood SP, Krause DO, Florin TH. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol.* 2003;95(3):508-20.
205. Wang M, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;54(2):219-31.
206. Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2 Suppl):410S-4S.
207. Wilson M. large intestine. Microbial inhabitants of humans their ecology and role in health disease. New York: Cambridge university press; 2005.
208. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998;41(2):85-101.
209. Gordon HA, Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol Rev.* 1971;35(4):390-429.
210. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307(5717):1915-20.
211. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15451-5.
212. Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* 2004;12(3):129-34.
213. Neu J, Douglas-Escobar M, Lopez M. Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr Clin Pract.* 2007;22(2):174-82.
214. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:283-307.
215. Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes. *Clin Chem.* 2013;59(4):617-28.
216. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(3):235-43.
217. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* 2003;62(1):67-72.
218. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1031-64.
219. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr.* 2007;137(3 Suppl 2):751S-5S.
220. Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W, Van de Wiele T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev.* 2011;69(5):245-58.

221. Teitelbaum JE, Walker WA. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:107-38.
222. van der Waaij D. History of recognition and measurement of colonization resistance of the digestive tract as an introduction to selective gastrointestinal decontamination. *Epidemiol Infect.* 1992;109(3):315-26.
223. Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol.* 1986;132(6):1647-56.
224. Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* 2000;47(5):646-52.
225. Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol.* 2010;107:243-74.
226. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. 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.* 2000;83(3):F186-92.
227. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol.* 2004;12(12):562-8.
228. Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology.* 2000;100(1):119-30.
229. Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology.* 1996;89(4):494-501.
230. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001;292(5519):1115-8.
231. Steck N, Mueller K, Schemann M, Haller D. Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut.* 2012;61(11):1610-8.
232. Pruteanu M, Hyland NP, Clarke DJ, Kiely B, Shanahan F. Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(5):1189-200.
233. Ou G, Hedberg M, Hörstedt P, Baranov V, Forsberg G, Drobni M, et al. Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(12):3058-67.
234. Nistal E. Estudio y comparación de la microbiota intestinal en individuos no celíacos frente a pacientes diagnosticados de enfermedad celíaca. Tesis Doctoral, León: Universidad de León; 2011.
235. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(10):577-89.
236. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr.* 2009;102(8):1154-60.
237. Sánchez E, Laparra JM, Sanz Y. Discerning the Role of *Bacteroides fragilis* in Celiac Disease Pathogenesis. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(18):6507-15.
238. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut.* 1991;32(4):439-42.
239. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One.* 2011;6(1):e16393.
240. Greer JB, O'Keefe SJ. Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Front Physiol.* 2011;1:168.
241. Stephani J, Radulovic K, Niess JH. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011;59(3):161-77.
242. Sollid LM, Gray GM. A role for bacteria in celiac disease? *Am J Gastroenterol.* 2004;99(5):905-6.

243. Schippa S, Iebba V, Barbato M, Di Nardo G, Totino V, Checchi MP, et al. A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. *BMC Microbiol.* 2010;10:175.
244. Rubio-Tapia A, Barton SH, Rosenblatt JE, Murray JA. Prevalence of small intestine bacterial overgrowth diagnosed by quantitative culture of intestinal aspirate in celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(2):157-61.
245. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G. High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in celiac patients with persistence of gastrointestinal symptoms after gluten withdrawal. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(4):839-43.
246. Di Cagno R, Rizzello CG, Gagliardi F, Ricciuti P, Ndagijimana M, Francavilla R, et al. Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(12):3963-71.
247. Kopecný J, Mrázek J, Fliegerová K, Frühauf P, Tucková L. The intestinal microflora of childhood patients with indicated celiac disease. *Folia Microbiol (Praha).* 2008;53(3):214-6.
248. Nistal E, Caminero A, Vivas S, Ruiz de Morales JM, Sáenz de Miera LE, Rodríguez-Aparicio LB, et al. Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. *Biochimie.* 2012;94(8):1724-9.
249. Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, et al. Gut microflora associated characteristics in first-degree relatives of children with celiac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(10):1204-8.
250. Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, et al. Screening-detected and symptomatic untreated celiac children show similar gut microflora-associated characteristics. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(9):1059-62.
251. Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51(3):562-8.
252. De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol.* 2010;10:63.
253. Sánchez E, Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Reduced diversity and increased virulence-gene carriage in intestinal enterobacteria of coeliac children. *BMC Gastroenterol.* 2008;8:50.
254. Sánchez E, De Palma G, Capilla A, Nova E, Pozo T, Castillejo G, et al. Influence of environmental and genetic factors linked to celiac disease risk on infant gut colonization by *Bacteroides* species. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(15):5316-23.
255. Sánchez E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal *Staphylococcus spp.* and virulent features associated with coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2012;65(9):830-4.
256. Ramare F, Hautefort I, Verhe F, Raibaud P, Iovanna J. Inactivation of tryptic activity by a human-derived strain of *Bacteroides distasonis* in the large intestines of gnotobiotic rats and mice. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(4):1434-6.
257. Gass J, Khosla C. Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(3):345-55.
258. Polgár L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):349-62.
259. Venäläinen JI, Juvonen RO, Männistö PT. Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. *Eur J Biochem.* 2004;271(13):2705-15.
260. Goossens F, De Meester I, Vanhoof G, Scharpé S. A sensitive method for the assay of serum prolyl endopeptidase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992;30(4):235-8.
261. Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem.* 1976;74(2):466-76.
262. Elgün S, Keskinoglu A, Kumbasar H. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activity. Decrease in depression. *Psychoneuroendocrinology.* 1999;24(8):823-32.
263. Whelan K, Judd PA, Tuohy KM, Gibson GR, Preedy VR, Taylor MA. Fecal microbiota in patients receiving enteral feeding are highly variable and may be altered in those who develop diarrhea. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):240-7.

264. Zhao G, Nyman M, Jönsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2006;20(8):674-82.
265. Ranilla MJ, Carro MD, López S, Newbold CJ, Wallace RJ. Influence of nitrogen source on the fermentation of fibre from barley straw and sugarbeet pulp by ruminal micro-organisms in vitro. *Br J Nutr.* 2001;86(6):717-24.
266. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular cloning: a Laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982.
267. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
268. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 1981;114(1):193-7.
269. Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 1979;16(1):191-200.
270. Fischer SG, Lerman LS. 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.* 1983;80(6):1579-83.
271. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1987;155:501-27.
272. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1987;155:501-27.
273. Børresen AL, Hovig E, Brøgger A. Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes. *Mutat Res.* 1988;202(1):77-83.
274. Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(1):297-303.
275. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-402.
276. Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, et al. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Database issue):D169-72.
277. Kumar S. A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. *Mol Biol Evol.* 1996;13(4):584-93.
278. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993;10(3):512-26.
279. Morón B, Cebolla A, Manyani H, Alvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas MeC, et al. 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.* 2008;87(2):405-14.
280. Morón B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, López MC, et al. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One.* 2008;3(5):e2294.
281. Van Der Gucht K, Sabbe K, De Meester L, Vloemans N, Zwart G, Gillis M, et al. Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environ Microbiol.* 2001;3(11):680-90.
282. Yoshimura F, Nishikata M, Suzuki T, Hoover CI, Newbrun E. Characterization of a trypsin-like protease from the bacterium *Bacteroides gingivalis* isolated from human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1984;29(7):559-64.

283. Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)*. 2005;108(4):277-92.
284. Kumagai Y, Yajima A, Konishi K. Peptidase activity of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by *Porphyromonas gingivalis* is important but not sufficient for virulence. *Microbiol Immunol*. 2003;47(10):735-43.
285. Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22(1):1-23.
286. Jobin MC, Grenier D. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;220(1):113-9.
287. Chen YS, Christensen JE, Broadbent JR, Steele JL. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(2):1276-82.
288. Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr*. 2000;130(7):1857S-64S.
289. Elsdén SR, Hilton MG. Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Arch Microbiol*. 1978;117(2):165-72.
290. Barker HA. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annu Rev Biochem*. 1981;50:23-40.
291. McKnite AM, Perez-Munoz ME, Lu L, Williams EG, Brewer S, Andreux PA, et al. Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits. *PLoS One*. 2012;7(6):e39191.
292. Toivanen P, Vaahtovuori J, Eerola E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infect Immun*. 2001;69(4):2372-7.
293. Griffiths MW, Tellez AM. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Front Microbiol*. 2013;4:30.
294. Beganović J, Kos B, Leboš Pavunc A, Uroić K, Džidara P, Sušković J. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*. 2013;20:58-64.
295. Shah HN, Gharbia SE. Ecophysiology and taxonomy of *Bacteroides* and related taxa. *Clin Infect Dis*. 1993;16 Suppl 4:S160-7.
296. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäki M, et al. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):552-8.
297. Steck N, Hoffmann M, Sava IG, Kim SC, Hahne H, Tonkonogy SL, et al. *Enterococcus faecalis* metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2011;141(3):959-71.
298. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011;60(5):631-7.

ANEXOS

ANEXO 1: Secuencia del gen ARN ribosomal 16S de *Escherichia coli*. Las zonas sombreadas de color gris representan zonas de variabilidad, mientras que las regiones coloreadas y subrayadas se corresponden con los cebadores universales empleadas en los diferentes experimentos.

AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCG

Cebador 27 F

AACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG

V1

AAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA

V2

CCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTTGTGGT

GGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA

ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG

Cebador HDA1

CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGA

GGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT

V3

CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC

Cebador HDA2

GCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGA

V4

TACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA

GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA

GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAG

GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGC

V5

CGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT

Cebador E939R

TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAAAAGG

V6

ANEXO 2: Árbol filogenético correspondiente de las bacterias secuenciadas a partir de las bandas generadas por la técnica PCR-DGGE del medio MCG-3

