



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

**PAPEL DE LA MICROBIOTA
HUMANA EN EL METABOLISMO
DEL GLUTEN**



Memoria presentada por la Licenciada Alexandra Rodríguez Herrán para la obtención
del grado de Doctor por la Universidad de León

León, 2015



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Dr. D. Francisco Javier Casqueiro Blanco como Director de la Tesis Doctoral titulada "Papel de la microbiota humana en el metabolismo del gluten" realizada por Dña. Alexandra Rodríguez Herrán en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 1 de septiembre de 2015



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología en su reunión celebrada el día de Septiembre de 2015 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Papel de la microbiota humana en el metabolismo del gluten”, dirigida por el Dr. D. Francisco Javier Casqueiro Blanco, elaborada por Dña. Alexandra Rodríguez Herrán y cuyo título en inglés es el siguiente “Role of human microbiota in gluten metabolism”.

Lo que firmo, en León a de septiembre de 2015.

Vº Bº

Presidente de la Comisión Académica,

El Secretario,

Fdo.: Ana Isabel González Cordero

Fdo.: Carlos Polanco de la Puente

A mi familia

*If we knew what we were doing, it
wouldn't be called research, would it?*

Albert Einstein

Durante estos años son muchas las personas que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.

En primer lugar quiero dar las gracias al director de esta Tesis, el Dr. Javier Casqueiro, por confiar en mí y haberme dado la oportunidad de hacer la Tesis en un tema tan bonito e interesante así como por su apoyo. También quiero agradecerle el ambiente de trabajo creado, haciendo que el grupo fuese como una pequeña familia.

En segundo lugar quiero dar las gracias a mis compañeros y amigos con los cuales he compartido laboratorio e incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme. Quiero agradecer a Esther su esfuerzo para poner en marcha el laboratorio. Gracias por transmitirme todo tu conocimiento; has sido una gran maestra y amiga y el pilar sobre el que apoyarme siempre que me asaltaban las dudas. También quiero dar las gracias a Alberto, no solo por ayudarme con las actividades proteolíticas, sino también por hacer del trabajo algo divertido. El último año he echado de menos incluso tus constantes discusiones en alto contigo mismo y el hecho de tener que dedicarme 10 minutos todos los días a trabajar en la "fábrica de bolis" para poder escribir. Gracias por no haberte olvidado de nosotros y seguir ayudando desde el otro lado del charco. A Jenifer... que le puedo decir que ella no sepa. Estos dos últimos años no hubieran sido lo mismo sin ti. No sé si hubiera sobrevivido el final de esta Tesis si tú no hubieras estado a mi lado apoyándome constantemente. También quiero agradecerle de forma especial su colaboración en la caracterización de los lactobacilos. A los tres, solo puedo decirles que habéis sido los mejores compañeros de trabajo con los que se podría soñar y que me encantaría volver a trabajar con vosotros en un futuro. ¡Gracias!

Aunque pasara poco tiempo con nosotros, quiero agradecer a Sandra toda su ayuda en el trabajo de caracterización de los lactobacilos. En especial por repartirse con Jenifer y conmigo las horas intempestuosas en las que hubo que venir el alguna ocasión. Todo ese trabajo hubiera sido imposible sin su ayuda.

Al Dr. Santiago Vivas por proporcionarme las biopsias sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible. Además quiero agradecerle su apoyo para que el grupo saliese adelante, así como sus consejos para la elaboración de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Jose María García Ruiz de Morales por ser una persona maravillosa y haber estado dispuesto siempre a trabajar el triple para ayudarnos a que los proyectos saliesen adelante. También quiero agradecerle sus clases magistrales sobre inmunología; es un placer escucharle hablar.

Al Dr. Leandro Aparicio y al Dr. Miguel Ángel Ferrero, por su colaboración y sus consejos. No solo fueron unos profesores magníficos, sino que son unas personas increíbles siempre dispuestas a ayudar.

También me gustaría agradecer al Dr. Schuppan por permitirme hacer una estancia en su laboratorio en Mainz, Alemania

Por supuesto merece un agradecimiento especial el Dr. Moisés Laparra, por sus ánimos y su ayuda para la obtención de una beca EMBO. Sin él, mi estancia en Alemania no hubiera sido posible y desde luego, no hubiera sido la misma.

A todo el grupo de cromatografía de la Universidad de León, en especial a Virginia y a nuestro técnico Domingo, por las miles de horas que pasaron conmigo intentando solucionar problemas de los equipos. Gracias a ellos aprendí a conectar bombas, cambiar válvulas... en fin, el oficio de la "fontanería" del HPLC.

También quiero agradecer a todas las personas que participaron en el estudio cediendo un pedacito de ellos a favor de la ciencia. Gracias por aportar vuestro granito de arena.

A todos los compañeros de Área de Microbiología, amigos y gente que ha pasado por el laboratorio y ha colaborado de una forma u otra a que esta Tesis se pudiera realizar, gracias.

A Salva por ser el principal responsable de que este trabajo llegara a buen puerto. Además de tu gran ayuda con el diseño gráfico quiero darte las gracias por estar a mi lado todos y cada uno de los días que duró la realización de esta Tesis, por tu apoyo incondicional, tu paciencia infinita y por haberme hecho creer cada día que podía hacerlo. Gracias por tu cariño y sobre todo por cumplir la misión imposible de hacerme sonreír en los días malos. En definitiva, gracias por hacer de este difícil camino un paseo a tu lado.

Por último pero no por ello menos importante, quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermana por haber estado siempre a mi lado y por animarme a perseguir mis sueños. Por ayudarme a tomar las decisiones correctas, apoyarme en los momentos difíciles y darme palabras de aliento cuando el mundo se me venía encima. Sois los mejores padres que una hija podría desear. Nunca hubiera llegado tan lejos si no hubiera tenido vuestro apoyo. ¡Gracias!

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL GLUTEN	3
1.1. Evolución de los cultivos de trigo	3
1.2. Qué es el gluten	3
1.2.1. Gliadinas.....	4
1.2.2. Gluteninas	5
1.2.3. Prolaminas.....	6
1.3. Enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten	7
2. LA ENFERMEDAD CELIACA	9
2.1. Concepto e historia	9
2.2. Presentación clínica y diagnóstico	10
2.3. Desencadenantes de la enfermedad	12
2.3.1. Factor ambiental: el gluten	12
2.3.2. Factor genético.....	14
2.3.3. Otros factores ambientales.....	15
2.4. Proceso patológico.....	16
2.5. Tratamiento actual y su problemática	19
2.6. Tratamientos alternativos.....	19
2.6.1. Reducción del gluten <i>ex vivo</i>	20
2.6.2. Terapia oral	21
2.6.3. Probióticos.....	23
2.6.4. Bloqueo del gluten por copolímeros	24
2.6.5. Disminución de la permeabilidad celular	24
2.6.6. Bloqueo de la TGt.....	24
2.6.7. Inducción de tolerancia oral.....	25
3. MICROBIOTA INTESTINAL Y METABOLISMO DEL GLUTEN	25
3.1. Desarrollo y composición de la microbiota intestinal	26
3.2. Funciones de la microbiota intestinal	29
3.2.1. Función metabólica	29
3.2.2. Función protectora.....	31
3.3. Microbiota intestinal y enfermedad	32
3.3.1. Microbiota intestinal y enfermedad celiaca.....	33
3.4. Metabolismo del gluten: microorganismos implicados.....	37
II. OBJETIVOS.....	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	47

1. SUJETOS DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	49
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	50
3. MICROORGANISMOS Y ENZIMAS EMPLEADOS	53
4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	54
4.1. Aislamiento de microorganismos de biopsia.....	54
4.2. Mantenimiento de los microorganismos.....	54
4.3. Curvas de crecimiento	55
4.4. Lisado de los microorganismos.....	55
5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	56
5.1. Extracción de ADN genómico de cultivos bacterianos.....	56
5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	58
5.3. Ligación del ADN en un vector.....	60
5.4. Transformación de <i>E. coli</i>	61
5.5. Extracción del ADN plasmídico de <i>E. coli</i> : minipreparaciones.....	62
5.6. Digestión del ADN con enzimas de restricción	63
5.7. Purificación del ADN plasmídico	64
5.8. Electroforesis en geles de agarosa.....	65
5.9. Electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE)	66
6. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	69
7. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	71
7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida y zimografía	71
7.2. <i>Western Blott</i>	72
8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	74
8.1. Actividad glutenásica y actividad gelatinásica	74
8.2. Actividad peptidolítica frente al 33-mer	75
8.3. Actividad PEP	77
8.4. Actividad DPPIV.....	78
8.5. Actividad caseinolítica.....	79
8.6. Actividades elastásica y mucilaginásica	80
8.7. Actividad peptidoglicano hidrolásica	80
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE MICROORGANISMOS DUODENALES.....	85
1.1. Análisis molecular mediante PCR-DGGE de la microbiota duodenal.....	85
1.2. Aislamiento e identificación de la microbiota duodenal implicada en el metabolismo del gluten	89
1.3. Estudio de las actividades glutenásica y gelatinásica.....	96
1.4. Estudio de la digestión del 33-mer	97

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS LACTOBACILOS AISLADOS DE BIOPSIAS DUODENALES	101
2.1. Estudio de la presencia de factores de patogenicidad.....	102
2.2. Caracterización de los patrones de crecimiento	103
2.3. Estudio de la producción de autolisinas.....	105
2.4. Estudio de la especificidad de las lisinas	107
2.5. Relación entre la producción de autolisinas y la hidrólisis del 33-mer empleando MRS como medio de crecimiento	110
2.6. Determinación de la localización celular de la enzima con actividad peptidolítica frente al 33-mer.....	112
2.7. Relación entre la producción de autolisinas y la hidrólisis del 33-mer empleando MCG como medio de crecimiento	115
3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTENÁSICA EXTRACELULAR DE <i>B. pumilus</i> CT56.5, <i>S. maltophilia</i> CA18.5, <i>P.aeruginosa</i> CT46.1 Y <i>Ser. marcescens</i> CECT 846.....	117
3.1. Estudio del crecimiento empleando gluten como fuente de nitrógeno en <i>Ser. marcescens</i> CECT 846, <i>S. maltophilia</i> CA18.5, <i>P. aeruginosa</i> CT46.1 y <i>B. pumilus</i> CT56.5.....	118
3.2. Estudio de las actividades glutenásicas en función de la temperatura y del pH.....	120
3.3. Determinación de las actividades PEP y DPPIV.....	123
3.4. Estudio de la hidrólisis del 33-mer en función del tiempo de incubación.....	124
3.5. Estudio de destoxificación del 33-mer puro	127
3.6. Estudio de reducción de epítomos tóxicos en un cultivo con gluten.....	128
3.7. Estudio de la actividad hidrolítica frente a los ATIs.....	129
3.8. Identificación de las enzimas responsables de la actividad glutenásica.....	130
3.8.1. Identificación de la enzima con actividad glutenásica de <i>Ser. marcescens</i> CECT 846	131
3.8.2. Identificación de las enzimas con actividad glutenásica de <i>S. maltophilia</i> CA18.5	132
4. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTENÁSICA DE LA SERRAPEPTASA	133
4.1. Comparación de la serrapeptasa de <i>S. marcescens</i> CECT 846 con las serrapeptasas ya descritas	133
4.2. Estudio de inhibición de la actividad glutenásica de <i>S. marcescens</i> CECT 846 por EDTA.....	135
4.3. Estudio de la actividad glutenásica de la serrapeptasa en función de la temperatura y del pH.....	136
4.4. Estudio de la estabilidad de la serrapeptasa a distintas temperaturas y pHs	137
4.5. Determinación de las actividades PEP y DPPIV.....	139
4.6. Estudio de la hidrólisis del 33-mer en función del tiempo de incubación.....	139

4.7. Estudio de la actividad hidrolítica frente a los ATIs.....	140
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	143
1. El intestino delgado humano está habitado por bacterias implicadas en el metabolismo del gluten.....	145
2. <i>Lactobacillus</i> es el género mayoritario identificado en el intestino delgado y algunas cepas poseen actividad peptidolítica frente al 33-mer	147
3. Las bacterias <i>B. pumilus</i> CT56.5, <i>S. maltophilia</i> CA18.5, <i>P. aeruginosa</i> CT46.1 así como la enzima serrapeptasa reducen de forma efectiva la toxicidad del gluten.....	149
VI. CONCLUSIONES	153
VII. BIBLIOGRAFÍA	157
VIII. ANEXOS	177

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal
AMN	Aminopeptidasa N
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato Amónico
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosomal
AGCC	Ácidos Grasos de Cadena Corta
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ATI	Inhibidor de α -Tripsina/Amilasa
BioEdit	<i>Biological sequence alignment Editor</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA	Paciente Celiaco Activo
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CT	Paciente Celiaco Tratado
Da	Dalton
DCPI	Dipeptidil carboxipeptidasa I
DGGE	Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
DPPIV	Dipeptidil peptidasa IV
DSG	Dieta Sin Gluten
DTT	Ditiotreitol
EC	Enfermedad Celiaca
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
F	Familiar de paciente celiaco

FISH	Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i>
GAPM	Gliadinas de Alto Peso Molecular
GI	Gastrointestinal
GLBPM	Gluteninas de Bajo Peso Molecular
GLAPM	Gluteninas de Alto Peso Molecular
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
IEL	Linfocitos Intraepiteliales
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
Kam	Kanamicina
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight</i>
MCG	Medio Con Gluten
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MSG	Medio Sin Gluten
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDA	<i>Photodiode Array</i>
PEP	Prolilendopeptidasa
P(HEMA-co-SS)	Polihidroximetilmetacrilato-co-estireno sulfonato
ppm	partes por millón
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno

QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RP	<i>Reverse Phase</i>
rpm	revoluciones por minuto
S	Voluntario Sano
SDS	Duodecilsulfato Sódico
TAE	Tris Acetato EDTA
TCA	Ácido Tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGt	Transglutaminasa tisular
Tm	Temperatura de <i>melting</i> o de fusión
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Tris	tri-(hidroximetil)-aminometano
TTGE	Electroforesis en Gradiente Temporal de Temperatura
U	Unidades
UA	Unidades Arbitrarias
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

1. EL GLUTEN

1.1. Evolución de los cultivos de trigo

El comienzo de la agricultura supuso un gran paso en la evolución ya que el simple hecho de poder almacenar el grano de los cultivos permitió pasar de una vida nómada, al asentamiento y formación de una civilización (Fasano, 2009). El trigo se comenzó a domesticar con el fin de usarlo para el consumo humano hace aproximadamente 10000 años en la región denominada el Creciente Fértil la cual se corresponde con parte de los territorios del Levante mediterráneo, Mesopotamia y Persia.

Las primeras especies de trigo cultivadas fueron diploides y tetraploides. Mediante la selección artificial por parte del hombre, estas especies de trigo fueron evolucionando, sufriendo varios cambios morfológicos como por ejemplo el agrandamiento de los granos. Otro de los grandes cambios que sufrió el trigo, fue la hibridación del trigo tetraploide con una hierba salvaje dando lugar a un trigo con genoma hexaploide. Este trigo representa el 95% del trigo consumido en la actualidad (Curtis y Halford, 2014).

El trigo junto con el arroz son hoy en día los cereales más importantes empleados para el consumo humano (Shewry y Halford, 2002; Curtis y Halford, 2014). Se estima que se cosechan alrededor de 600 millones de toneladas de trigo al año, a lo largo de un área geográfica extensa. Parte del éxito de este cereal se debe a la gran capacidad de adaptación que tiene y a los altos rendimientos que producen sus cultivos, pero el factor clave que ha hecho que predomine sobre otros cereales, es que la masa elaborada con su harina presenta unas propiedades únicas que son muy apreciadas en la industria alimentaria. Estas propiedades se deben a las proteínas que conforman el gluten (Shewry, 2009).

1.2. Qué es el gluten

Estrictamente hablando, el gluten se puede definir como la masa que queda tras eliminar los componentes solubles en agua de la harina de trigo. Dependiendo de la intensidad del lavado, el sólido resultante contendrá entre un 75-85% de proteínas y entre un 5-15% de lípidos y carbohidratos insolubles en agua. Sin embargo, comúnmente empleamos el término gluten para referirnos a las proteínas de reserva del trigo; las gliadinas y gluteninas (Wieser, 2007).

El gluten fue por primera vez aislado y descrito por Beccari en el año 1745 (Shewry y Halford, 2002) y desde entonces se han realizado varias clasificaciones de su complejo entramado proteico. Una de las clasificaciones más utilizadas se basa en la solubilidad de las proteínas, y fue realizada por Osborne *et al.*, (1924). Siguiendo este criterio, las proteínas que se encuentran en el endospermo del trigo se pueden clasificar en las albúminas solubles en agua, las globulinas solubles en soluciones salinas, las gliadinas solubles en soluciones alcohólicas, y las gluteninas insolubles en soluciones acuosas, salinas y alcohólicas (Ciccocioppo *et al.*, 2005). La fracción que denominamos gluten está compuesta por las gliadinas y gluteninas. A su vez, ambas están compuestas por una mezcla compleja de más de 50 proteínas individuales que se pueden observar por electroforesis en 2D (Wieser, 2007).

Ambas fracciones proteicas contribuyen de forma notable a las propiedades reológicas de la masa de harina de trigo, pero sus funciones son divergentes. Mientras que las gliadinas contribuyen principalmente a la viscosidad y extensibilidad de la masa, las gluteninas le aportan cohesión y elasticidad (Wieser *et al.*, 2006). El conjunto de todas estas propiedades es lo que hace que el trigo sea uno de los alimentos que forman la base de la pirámide de la alimentación hoy en día.

1.2.1. Gliadinas

Las gliadinas son proteínas generalmente monoméricas, solubles en etanol al 60%. En base a su movilidad electroforética a bajo pH se pueden clasificar en: α -gliadinas, β -gliadinas, γ -gliadinas y ω -gliadinas. Sin embargo una clasificación más reciente las ordena según la secuencia aminoacídica de la región N-terminal, y las α -gliadinas y β -gliadinas pasan a constituir un solo grupo denominado α -gliadinas (Shewry *et al.*, 1986; Wieser *et al.*, 1987). Las ω -gliadinas se caracterizan por tener mayor peso molecular (40-50 kDa), presentar casi en su totalidad regiones repetitivas ricas en glutamina (Q) y prolina (P) tales como PQQPFPQQ, y carecer prácticamente todas de residuos de cisteína. En cambio α -gliadinas y γ -gliadinas tienen menor peso molecular (28-35 kDa) y menos contenido de prolina y glutamina con respecto a las ω -gliadinas. Además poseen cisteína en su secuencia aminoacídica que le permite formar enlaces disulfuro. La principal diferencia entre las α -gliadinas y γ -gliadinas es el contenido de algunos aminoácidos como la tirosina y la presencia de diferentes dominios N-terminal y C-terminal. La región N-terminal de ambas gliadinas se caracteriza por la presencia de regiones repetitivas ricas en glutamina, prolina, fenilalanina y tirosina. En las α -gliadinas, estas regiones repetitivas son dodecapéptidos como QPQPFPQQPYP

que se repiten normalmente cinco veces y pueden verse modificados por la sustitución de residuos únicos. En las γ -gliadinas aparece repetida hasta 16 veces la secuencia QPQQPFP con residuos adicionales intercalados. Sin embargo, la región C-terminal de las gliadinas no tiene regiones repetitivas y presenta una menor proporción de residuos de prolina y glutamina que el dominio N-terminal. Aunque este dominio es similar en ambos casos, las α -gliadinas tienen seis cisteínas y las γ -gliadinas ocho, por lo que pueden formar seis y ocho enlaces intercadena respectivamente (Wieser, 2007).

Aparte de las α , ω y γ , existen otros tipos de gliadinas que son minoritarias y se caracterizan por tener una proporción anormal de cisteínas. Estas gliadinas se conocen como gliadinas de alto peso molecular (GAPM), y se cree que su función podría ser la de actuar como terminadores en la polimerización de las gluteninas (Wieser, 2007).

1.2.2. Gluteninas

Las gluteninas son proteínas poliméricas insolubles en alcohol. Estas proteínas son capaces de formar alguno de los polímeros proteicos más grandes y complejos de la naturaleza, pudiendo alcanzar un tamaño de 10 millones de Da. Cuando las gluteninas son reducidas, se rompen los puentes disulfuro intercatenarios que mantenían unida la estructura y se liberan dos tipos de subunidades las cuales presentan una solubilidad en alcohol similar a la de las gliadinas. En función de su peso molecular las subunidades se clasifican como gluteninas de bajo peso molecular (GLBPM) con un tamaño aproximado entre 20-45 kDa y gluteninas de alto peso molecular (GLAPM) con un tamaño aproximado de 70-90 kDa (D'Ovidio y Masci, 2004; Wieser *et al.*, 2006; Wieser, 2007; Hurkman y Tanaka, 2007).

Las GLBPM son las gluteninas predominantes y representan aproximadamente el 20% de las proteínas del gluten (Wieser y Kieffer, 2001). Tanto por su composición aminoacídica como por su tamaño, son muy similares a las α -gliadinas y γ -gliadinas. Al igual que estas, tienen dos dominios diferenciados; el dominio N-terminal contiene secuencias repetidas ricas en prolina y glutamina como es QQQPPFS, y el dominio C-terminal contiene ocho residuos de cisteína (Wellner *et al.*, 2006). Seis de estos residuos están en posiciones homólogas a los de α/β -gliadinas y γ -gliadinas y permiten uniones disulfuro intracatenarios. Los dos residuos de cisteína adicionales, únicos en GLBPM, no pueden formar enlaces intracatenarios, quedando libres para generar uniones intercatenarias con otras proteínas del gluten diferentes (Wieser, 1996; Wieser, 2007).

Las GLAPM son las proteínas minoritarias del gluten, representando solo el 10% de las mismas. Estas proteínas pueden ser divididas según su peso molecular en dos tipos: tipo-X (83-88 kDa) y tipo-Y (67-74 kDa). Todas ellas están formadas por 3 dominios estructurales: un dominio N-terminal no repetitivo (Dominio A) de 80-105 residuos, una región central (Dominio B) mayoritaria (480-700 residuos) formado por regiones repetitivas del hexapéptido QQPGQG con otros hexapéptidos y tripéptidos insertados; y el dominio C-terminal de 42 residuos (Dominio C). Las diferencias más importantes entre las GLAPM tipo-X y las tipo-Y se encuentran en los dominios A y B. Por ejemplo, las tipo-Y presentan una inserción de 18 residuos con dos cisteínas en el dominio A y los motivos repetidos son menos frecuentes y se encuentran más modificados en el dominio B (Wieser, 2007).

1.2.3. Prolaminas

Las gliadinas y gluteninas se denominan comúnmente prolaminas debido a su alto contenido en residuos de prolina y glutamina los cuales pueden llegar a representar entre un 60 y 80% del total de aminoácidos. Todas las prolaminas presentan una estructura similar con dominios conservados característicos de cada tipo de prolamina, secuencias típicas en el extremo N-terminal y extensas regiones de secuencias repetitivas (Shewry y Halford, 2002). Las regiones repetitivas son características de las prolaminas, y en ellas siempre hay prolinas y glutaminas. Los extremos N-terminal y C-terminal y algunas secuencias intercaladas tienen estructura secundaria de α -hélice. Sin embargo, las secuencias repetitivas forman estructuras de giro- β . Esta estructura de giro- β aparece con regularidad, debido a la presencia frecuente de las secuencias repetitivas, dando lugar a 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 los diferentes agentes desnaturizantes (Miles *et al.*, 1991).

Las prolaminas de las que hemos hablado hasta ahora son las gliadinas y gluteninas, las cuales se encuentran en el endospermo del grano de trigo. Sin embargo, estas no son las únicas prolaminas que existen; todos los cereales tienen prolaminas cuya función es actuar como proteínas de reserva, y aportar el nitrógeno necesario para la síntesis de proteínas durante su germinación. 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 homología y propiedades físico-químicas en común (Hamer, 2005) (Tabla 1). Las prolaminas presentes en la

cebada y el centeno son denominadas hordeínas y secalinas respectivamente. Estas proteínas también están presentes en otros cereales de consumo menos frecuente que están relacionados evolutivamente con el trigo como son la espelta (también llamada trigo salvaje) o el triticale (híbrido de trigo y centeno) (San Mauro Martín *et al.*, 2014).

Hay que tener en cuenta por lo tanto, que cuando comúnmente hablamos de gluten, no nos referimos solo a las prolaminas del trigo, sino a todas las proteínas desencadenantes de la enfermedad celiaca, y esto incluye también a las prolaminas de la cebada, el centeno, y de aquellos cereales que están estrechamente relacionados.

En el caso de la avena, esta se encuentra en la misma subfamilia que los cereales anteriores (*Pooideae*), pero pertenece a la tribu *Aveneae* y presenta algunas características diferentes. El análisis de secuencia de sus prolaminas, denominadas aveninas, mostró que, a pesar de que existen secuencias de unidades repetitivas, estas difieren de las encontradas en el trigo, la cebada y el centeno (Shewry y Tatham, 1990; Mills *et al.*, 2004). Además las aveninas tienen significativamente menos prolaminas que sus homólogas (Kilmartin *et al.*, 2003). Hasta el día de hoy, hay mucha controversia acerca de su toxicidad para los enfermos de celiaquía, y no se ha llegado a ningún acuerdo. Algunas de las explicaciones propuestas son que solo ciertas variedades de avena son tóxicas, que la toxicidad depende del individuo, o que aquellos casos en los que se demostró su patogenicidad la avena sufría una contaminación cruzada con trigo, cebada o centeno (Ellis y Ciclitira, 2008; Comino *et al.*, 2011; Richman, 2012; Real *et al.*, 2012).

Tabla 1. Grupos de prolaminas presentes en el trigo la cebada y el centeno.

	Prolaminas				
	Gliadinas			Gluteninas	
Trigo	α -gliadinas	ω -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. Enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten

El trigo, se encuentra presente en muchos de los alimentos que forman parte de nuestra dieta diaria y constituye una fuente importante de proteínas y minerales (Shewry, 2009). Sin embargo, cada vez son más las patologías que se asocian a la

ingesta del gluten. Aunque el incremento en el número de individuos que padecen estas enfermedades podría deberse a la mejora de las técnicas de diagnóstico, hay varios factores adicionales que podrían haber contribuido a este aumento. Por una parte, hay que considerar que hay una expansión a nivel global de la dieta mediterránea, y esta dieta incluye muchos alimentos con gluten. Se estima que un adulto que siga esta dieta consume una media de 20 g gluten/día. Por otra parte, la mecanización de los cultivos así como el uso de pesticidas han favorecido el desarrollo de nuevas variedades de trigo con un mayor contenido en péptidos tóxicos. Además, la industrialización ha hecho que las masas empleadas para elaborar el pan y otros productos de repostería se fermenten menos tiempo, y tengan mayor cantidad de gluten ahora que en el pasado (Volta *et al.*, 2013).

En los años 80 la clasificación de los desórdenes causados por gluten era sencilla, ya que las únicas enfermedades en cuya patogénesis estaba claramente implicado eran la enfermedad celiaca y la dermatitis herpetiforme. Posteriormente se descubrió que había personas que mostraban una respuesta alérgica al trigo mediada por IgE. Más recientemente, se ha podido observar que entre el 0,6 y 6% de la población presenta sintomatología relacionada con la ingesta de gluten, pero tras realizar las pruebas correspondientes, la alergia y la enfermedad celiaca son descartadas como causas. Esta nueva patología se conoce como sensibilidad al gluten no celiaca (Sapone *et al.*, 2012; DiGiacomo *et al.*, 2013).

La última nomenclatura y clasificación de los desórdenes relacionados con el gluten, de acuerdo a la Conferencia Consenso en desórdenes relacionados con el gluten II que tuvo lugar en Londres en el 2011, incluye un total de 5 patologías: enfermedad celiaca, ataxia de gluten, dermatitis herpetiforme, alergia al trigo y sensibilidad al gluten (Sapone *et al.*, 2012) (Figura 1).

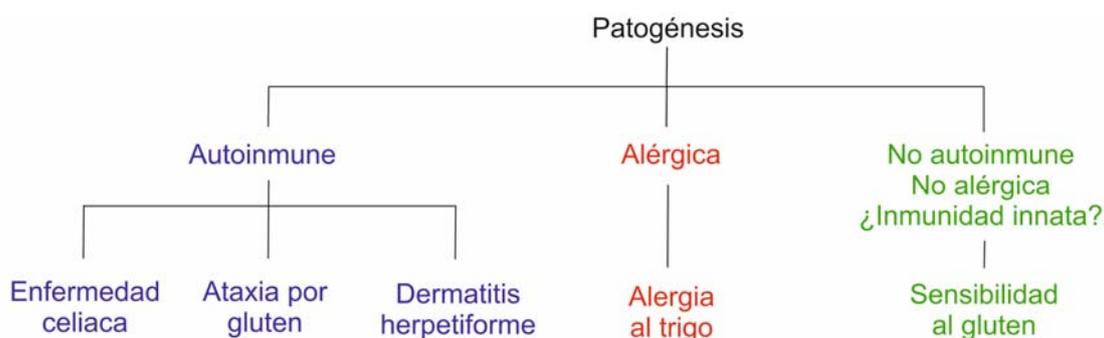


Figura 1. Patologías relacionadas con el gluten de acuerdo a la Conferencia Consenso en desórdenes relacionados con el gluten II (Londres, 2011).

A pesar del gran número de patologías emergentes relacionadas con el consumo del gluten, la más estudiada y conocida a día de hoy sigue siendo la enfermedad celiaca.

Pero, ¿Qué hace que el gluten sea tan dañino? Cuando un individuo ingiere un alimento, para obtener los nutrientes nitrogenados las proteínas son digeridas por las enzimas gastrointestinales, generándose productos más pequeños. Estos pequeños péptidos o los aminoácidos son absorbidos por los enterocitos y son incorporados al metabolismo del individuo. Sin embargo, esto no ocurre con las prolaminas que forman el gluten. Estas proteínas contienen un alto número de residuos de prolina y glutamina lo que hace que no puedan ser digeridas completamente en el tracto gastrointestinal (Hausch *et al.*, 2002). Esto se debe a que la prolina tiene una configuración espacial que dificulta el acceso de las proteasas a las regiones adyacentes, por lo que los péptidos ricos en prolina están protegidos frente a la hidrólisis enzimática (Vanhoof *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2003). Para su degradación son necesarias unas enzimas específicas denominadas prolilendopeptidasas (PEPs), y aquí radica el principal problema a la hora de la digestión del gluten; las enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal humano carecen de dicha actividad. La digestión incompleta del gluten va a resultar en la formación de péptidos de gran tamaño ricos en prolina y glutamina, que van a generar una respuesta inflamatoria en aquellos individuos que tienen una predisposición genética a padecer la enfermedad celiaca.

2. LA ENFERMEDAD CELIACA

2.1. Concepto e historia

La Organización Mundial de Gastroenterología define a la enfermedad celiaca (EC) como una enteropatía inflamatoria crónica de carácter autoinmune que afecta al intestino delgado en adultos y niños predispuestos genéticamente (Bai *et al.*, 2012).

El primer caso descrito se remonta al año 250 después de Cristo cuando Areteo de Capadocia, un médico griego describió por primera vez casos de diarrea, pérdida de peso y malestar general. Areteo denominó a la enfermedad que presentaba esta sintomatología *koiliakos*, por la palabra griega *koelia* que significa abdomen (Fasano, 2009; Gasbarrini y Mangiola, 2014). La antigüedad de la EC es apoyada por estudios más recientes. En el año 2012 Gasbarrini *et al.* extrajeron ADN de los restos de una mujer con signos de malnutrición encontrada en el yacimiento arqueológico de Cosa, y descubrieron que era portadora del haplotipo que predispone genéticamente a padecer la celiaquía; HLA-DQ2/DQ8. Los trabajos de Areteo fueron editados y traducidos por

Francis Adams y publicados por la Sydenham Society en 1856 pero no fue hasta 1888 cuando el médico Británico Samuel Gee daba a conocer un informe clínico claro sobre la condición celiaca con el título de “La afección celiaca” (Gee, 1888; Singer, 1942). En él se describe la EC como “una especie de indigestión crónica que podía observarse en todas las edades si bien ocurría, especialmente, en niños con edades comprendidas entre uno y cinco años”. Este médico británico llegó a sugerir correctamente que “la causa podría deberse a errores en la dieta”. Aunque la idea era acertada, la verdadera causa de la enfermedad se escapaba de su conocimiento, ya que llegó a sugerir como tratamiento alimentar a estos niños con finas rebanadas de pan tostadas por ambos lados (Fasano, 2009).

La identificación del gluten como el desencadenante de la EC no tuvo lugar hasta después de la segunda guerra mundial, cuando el pediatra holandés Willem-Karel Dicke asoció la escasez de pan que hubo en Holanda debido a la guerra con una disminución significativa de las muertes de niños afectados por la EC. Este pediatra también describió que una vez finalizado el conflicto, el pan volvió a ser un alimento asequible, y las muertes se incrementaron de nuevo a los niveles previos. Gracias a esta observación, otros científicos comenzaron a estudiar los distintos componentes del trigo, concluyendo finalmente que el desencadenante de la EC era el gluten (Fasano, 2009). Gracias a este descubrimiento, a partir de 1950 el tratamiento de los pacientes celíacos se ha basado en la dieta libre de gluten. Años más tarde, John W. Paulley describió los cambios histológicos que tenían lugar en el intestino de pacientes con EC (Paulley, 1954)

2.2. Presentación clínica y diagnóstico

La EC es una patología de distribución global, inicialmente asociada a una enfermedad infantil, aunque hoy en día es habitual su diagnóstico en adultos (Farrell y Kelly, 2002). Esta patología puede manifestarse tanto en hombres como mujeres, pero la prevalencia es más alta en el sexo femenino (Bardella *et al.*, 2005).

La EC puede cursar con síntomas intestinales, siendo los más característicos atrofia de las vellosidades intestinales (Figura 2), hiperplasia de las criptas, infiltración leucocitaria, diarrea o distensión abdominal, pero también puede presentar manifestaciones sistémicas como anemia u osteoporosis (Alaedini y Green, 2005).

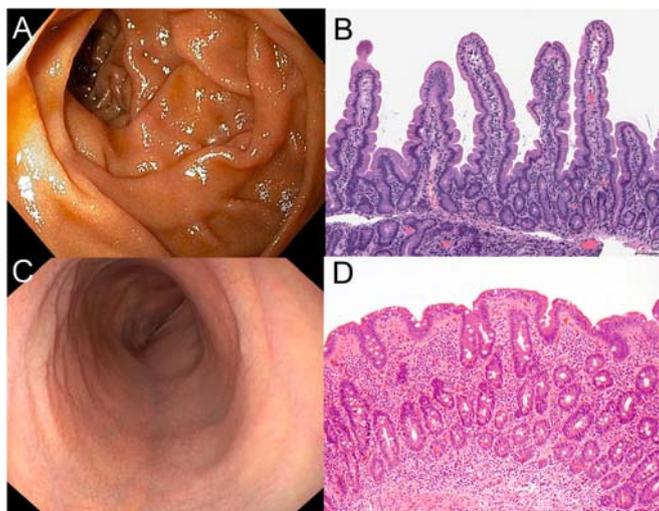


Figura 2. Comparación de la arquitectura vellositaria en la biopsia duodenal de un individuo sano (A y B) y un individuo con EC (C y D).

En función de las distintas manifestaciones de la enfermedad, la EC se clasifica como EC clásica, EC silente, EC latente y EC potencial. La EC clásica se caracteriza por ser una forma activa, con la presencia de una atrofia vellositaria intestinal intensa o total, y por presentar una serología positiva (Bernardo, 2008) además de cursar con los síntomas tradicionalmente asociados a la enfermedad como son la diarrea, o la distensión abdominal. Actualmente, a esta manifestación clásica se añaden nuevas presentaciones, que constituyen las manifestaciones no clásicas o atípicas de la enfermedad. Estas formas son la EC silente, latente y potencial (Ferguson *et al.*, 1993).

La EC silente es la que se asocia a aquellos individuos que presentan una alteración histológica duodenal, a pesar de que pueden ser completamente asintomáticos. Hablamos de EC latente cuando nos referimos a individuos que presentan marcadores serológicos positivos aunque no presentan atrofia vellositaria en el momento del diagnóstico, pero que han tenido las manifestaciones típicas incluyendo la atrofia intestinal en algún momento de su vida. Por último, La EC potencial abarca a todos los individuos que en el momento de diagnóstico no presentan la enfermedad, pero que debido a que portan el heterodímero HLA-DQ2/DQ8 y además en algunos casos son familiares de pacientes con la EC, podrían desarrollar esta patología (Bernardo, 2008).

La EC tiene una prevalencia mundial alrededor del 1% (Siegel *et al.*, 2006); sin embargo, se estima que solo el 10% de las personas afectadas son diagnosticadas (Vilppula *et al.*, 2009). Esto se debe a que no en todos los casos la EC presenta los síntomas tradicionalmente asociados a la enfermedad. La distribución de los distintos

tipos de EC, sigue un modelo tipo iceberg o pirámide (Figura 3) en el que por encima de la línea de flotación se encontrarían los pacientes con manifestaciones clásicas, mientras que sumergidos se encontrarían la mayor parte de los pacientes, que son aquellos que presentan formas no clásicas, y que por lo tanto en la mayoría de los casos no son diagnosticados (Bernardo, 2008).

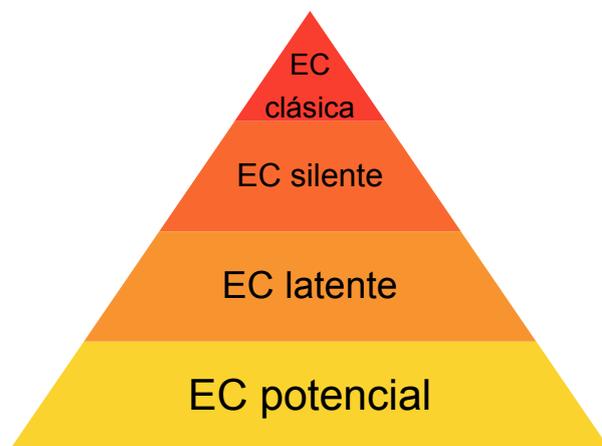


Figura 3. Modelo tipo pirámide o iceberg que indica las diferentes formas clínicas de la EC. La parte visible sería la EC clásica mientras que la parte sumergida corresponde a las nuevas formas clínicas de la enfermedad (EC silente, EC latente y EC potencial).

2.3. Desencadenantes de la enfermedad

2.3.1. Factor ambiental: el gluten

Se sabe que la enfermedad celíaca se desencadena por la ingesta de gluten en la dieta. Las proteínas que forman parte del gluten (gliadinas, gluteninas, hordeínas y secalinas) se caracterizan por su alto contenido en glutamina y prolina (Wieser, 2007). Las enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal presentes en el cuerpo humano no tienen actividad prolilendopeptidásica y por ello las prolaminas no son digeridas completamente, generándose algunos péptidos dañinos, responsables del desarrollo de esta patología (Hausch *et al.*, 2002).

Los péptidos que se generan por la digestión incompleta del gluten se pueden clasificar en “péptidos tóxicos” y “péptidos inmunogénicos” en función de cómo estén involucrados en la patogenia de la EC.

Los péptidos tóxicos son aquellos que inducen un daño en la mucosa mediante la activación de la respuesta inmune innata. Se ha visto que estos péptidos producen daño intestinal al ser añadidos a un cultivo de biopsia duodenal (Howdle *et al.*, 1981) y también

al ser administrados *in vivo* (Lahteenoja *et al.*, 2000; Ellis y Ciclitira, 2001). Uno de los hechos que apoyan la teoría de que los péptidos tóxicos actúan a través de la respuesta inmune innata, es que se ha visto que inducen la producción de IL-15, una citoquina que está relacionada con este tipo de inmunidad. Gracias al conocimiento de la secuencia de la α -gliadina, se han podido sintetizar una serie de péptidos comprendidos en esta región, y su toxicidad ha sido analizada (Ciccocioppo *et al.*, 2005). Algunos de los péptidos tóxicos más estudiados son el 19-mer (correspondiente a la región p31-49 de la α -gliadina) (de Ritis *et al.*, 1988; Sturgess *et al.*, 1994), o un fragmento más corto de este péptido, el 13-mer (p31-43) (Maiuri *et al.*, 1996).

Mientras que los péptidos tóxicos actúan a través de la respuesta inmune innata, los péptidos inmunogénicos son aquellos capaces de activar la respuesta inmune adaptativa. Estos péptidos inmunogénicos son capaces de estimular específicamente los linfocitos T restringidos por HLA-DQ2 o HLA-DQ8 obtenidos de la sangre periférica o de la mucosa intestinal de pacientes celíacos (Ciccocioppo *et al.*, 2005). Algunos de estos péptidos son considerados inmunodominantes. Este término abarca dos conceptos. Por un lado, hay que tener en cuenta que el daño causado por los péptidos inmunogénicos puede variar de una persona a otra. Se consideran péptidos inmunodominantes aquellos capaces de inducir una respuesta inmune específica en prácticamente todos los enfermos celíacos (Camarca *et al.*, 2012). Por otra parte, si se administra gluten a un paciente que ha estado bajo una dieta sin gluten (DSG), las células T que responden frente a los péptidos inmunodominantes son detectadas en la sangre periférica significativamente antes que aquellas células T que responden al resto de péptidos inmunogénicos (Stern *et al.*, 2001).

Se han identificado varios péptidos inmunogénicos principalmente en las α -gliadinas y en las γ -gliadinas, aunque también con menor frecuencia en las gluteninas de alto peso molecular (Di Sabatino y Corazza, 2009). El péptido inmunodominante más conocido y estudiado se encuentra en la región p57-89 de las α -gliadinas y se conoce como 33-mer. Shan *et al.* (2002) demostraron que el 33-mer inducía una fuerte activación de células T humanas en todos los pacientes celíacos estudiados, sin excepción. El alto carácter inmunogénico de este péptido se debe a la presencia de seis secuencias parcialmente superpuestas que incluyen tres epítopos inmunoestimuladores diferentes (Figura 4). Además, 13 de sus 33 aminoácidos son prolina, lo que hace que sea difícilmente hidrolizado. Hay datos tanto *in vitro* como *in vivo* en ratas y humanos que demuestran su estabilidad frente a la digestión por enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal (Shan *et al.*, 2002). Otro factor a tener en cuenta es que cuando

se compara con otros péptidos que forman parte de la gliadina, se observa que el 33-mer se une al HLA-DQ2 con mayor afinidad (Shan *et al.*, 2004).



Figura 4. El 33-mer presenta 6 secuencias que incluyen 3 epítopos inmunoestimuladores diferentes, cada uno de ellos representado en un color.

La secuencia de este péptido ha sido comparada con las prolaminas del centeno y de la cebada (Tabla 2), y se ha visto que estos cereales contienen péptidos con características muy similares, aunque no han sido estudiados en profundidad (Shan *et al.*, 2002).

Tabla 2. Péptidos similares al 33-mer presentes en el centeno y en la cebada.

Péptido	Prolamina de origen
LQLQPFPPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP	α 2-gliadina (33-mer)
QQQPFPPQQPIQQQPYPQQPYPQQPFPQQPF	B1-hordeína
QFPQPQQPTPIQQPFPQRPQQPFPQPQ	ω -secalina

2.3.2. Factor genético

El hecho principal que sugirió que los factores genéticos debían jugar un papel en el desarrollo de la celiaquía es la alta incidencia que se observa en miembros de la misma familia. En el caso de gemelos monocigóticos esta tasa de concordancia es de aproximadamente un 85% (Nistico *et al.*, 2006). Numerosos estudios demuestran que la presencia de los heterodímeros HLA-DQ2 (presente en el 90-95% de los pacientes) o HLA-DQ8 (presente en el 5-10% de los casos) es necesaria para el desarrollo de esta enfermedad. Se estima que el efecto genético atribuible al complejo HLA es del 53% (Sollid y Lie, 2005). Los dímeros HLA-DQ2/DQ8 están formados a partir de dos cadenas (α y β) que se forman por la expresión de los alelos HLA-DQ que se encuentran en el cromosoma 6. Los complejos HLA-DQ2/DQ8 se encuentran en la superficie de células presentadoras de antígenos (APCs) donde gracias a su estructura van a unirse y a presentar péptidos derivados de la digestión del gluten a los linfocitos T CD4+ (Kagnoff,

2007). La ausencia de los alelos DQ2 o DQ8 predice negativamente el desarrollo de la EC en prácticamente el 100% de los casos, lo cual es de utilidad para descartar su diagnóstico. Sin embargo, muchos individuos que portan estos alelos no desarrollan la EC, por lo que su presencia es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de esta patología (Kagnoff, 2007). Por esta razón se postula que un individuo además de ser susceptible genéticamente, tiene que presentar otra serie de factores que le predispongan a padecer la EC cuando ingiere gluten. La presencia de gemelos monocigóticos que difieren en la manifestación de la celiaquía apoya esta teoría (Brandtzaeg, 2006). Aunque se han estudiado otros genes fuera de la región HLA que podrían estar relacionados con la EC, no hay datos que sean significativamente relevantes. Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que el efecto de cada uno de estos genes sería muy pequeño (Sollid, 2002; Plenge, 2010).

2.3.3. Otros factores ambientales

Existen diversas y controvertidas opiniones acerca de los posibles factores implicados en el desarrollo de la EC. Uno de los factores debatidos más aceptados es la protección que ejerce la lactancia materna. Una revisión sistemática de todos los estudios realizados entre los años 1966 y 2004, recoge evidencia de que el incremento de la duración de la lactancia materna y la lactancia materna durante la introducción de gluten en la dieta, están asociados a un menor riesgo de desarrollar la EC. El inconveniente de estos estudios es que son a corto plazo y no queda claro si el papel de la lactancia materna es la protección frente a la enfermedad, o solo el retraso de su aparición (Akobeng *et al.*, 2006). Además de la lactancia materna, la edad de introducción del gluten, así como las cantidades y la forma de introducción, también parecen afectar al desarrollo de la EC (Schaart y Mearin, 2014). A pesar de los numerosos estudios que apoyan estas teorías, el debate sigue abierto. Un estudio reciente en el que se analizó la incidencia de EC en niños de 3 años a los que se les había administrado, durante la lactancia, bien pequeñas cantidades de gluten o bien un placebo, determinó que ni la introducción del gluten en pequeñas cantidades en los primeros meses de vida, ni el hecho de introducir el gluten mientras se mantiene la lactancia ejerce un papel protector frente a la EC (Vriezinga *et al.*, 2014).

Hay varios estudios que asocian el padecimiento de ciertas infecciones intestinales con un mayor riesgo de desarrollar la EC. Kagnoff *et al.* (1984) 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 los 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. En el año 2003, Nieuwenhuizen *et al.* observaron que la proteína HWP-1 de *Candida albicans* poseía una alta similitud con algunos de los epítomos tóxicos de las α y γ -gliadinas, y estipularon que las infecciones por esta levadura podrían promover la formación de anticuerpos frente al gluten y frente a la transglutaminasa tisular (TGt). Un estudio publicado por Corouge *et al.* (2015) apoya esta hipótesis. De forma similar, hay varios estudios que sugieren que las infecciones por rotavirus podrían estimular el desarrollo de la EC (Stene *et al.*, 2006). Dolcino *et al.* (2013) demostraron que los anticuerpos que se producen frente a la proteína viral del rotavirus (VP7), están implicados en procesos de apoptosis, inflamación y alteración de la integridad de la barrera epitelial, siendo todas estas características típicas de la EC. El efecto de otros patógenos como *Campylobacter jejuni* o *Giardia lamblia* también ha sido planteado (Plot y Amital, 2009).

Forsberg *et al.* (2004) encontraron por microscopía electrónica de barrido unas bacterias bacilares ancladas en el duodeno de niños con EC, que no estaban presentes en los niños sanos. Este estudio sugirió por primera vez el posible papel de las bacterias en la patogénesis de la EC. Desde entonces, son numerosos los estudios que intentan desenmascarar el papel, protector o dañino, que pueda ejercer la microbiota intestinal en relación con la EC. Las posibles implicaciones de la microbiota intestinal en la EC se tratarán con más detalle en el apartado 3 de la introducción de esta Tesis Doctoral.

Estudios recientes muestran que existen unas proteínas de bajo peso molecular presentes en el trigo y en los cereales relacionados, que son co-purificadas con algunas de las proteínas del gluten. Estas proteínas se denominan inhibidores de α -tripsina/amilasa (ATIs). Experimentos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* por Junker *et al.* (2012) han dejado en evidencia que los ATIs son fuertes activadores de la inmunidad innata. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que si bien el gluten es el principal componente de los cereales que desencadena la EC, no es el único (Biesiekierski y Iven, 2015).

2.4. Proceso patológico

Debido al alto contenido en prolina del gluten y a la ausencia de actividad PEP por parte de las enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal, una vez que el gluten

es ingerido en la dieta, se va a digerir parcialmente dando lugar a la acumulación de péptidos relativamente grandes como son el 19-mer y el 33-mer, ricos en prolina y glutamina (Hausch *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2002; Qiao *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2005). Para el 99% de los individuos, incluyendo la mayor parte de los que presentan los complejos HLA-DQ2/DQ8 esto no representa ningún problema. Sin embargo, en aquellos individuos con haplotipo HLA-DQ2/DQ8 que además tienen una susceptibilidad mayor a padecer la EC por factores adicionales ya sean genéticos, inmunológicos, ambientales o una combinación de ellos, los péptidos de gluten generados se van a acumular en la lámina propia y van a desencadenar el proceso inflamatorio responsable de la EC (Kagnoff, 2007).

Se han propuesto dos vías por las cuales los péptidos del gluten atravesarían la capa de células epiteliales y llegarían a la lámina propia; la vía paracelular y la vía transcelular. La vía transcelular está basada en la idea de que la permeabilidad de la mucosa está aumentada y los péptidos pasarían a la lámina propia a través de las zónulas oclusivas de las células epiteliales. Clemente *et al.* (2003) sugirieron que la sobreexpresión de zonulina producida por la presencia de gliadina podía producir un aumento de la permeabilidad y por lo tanto podía permitir el paso de los péptidos tóxicos desencadenándose la EC. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que el tamaño máximo de molécula que podría pasar a través de la vía transcelular es de 600 Da (Watson *et al.*, 2001) y péptidos como el 19-mer o el 33-mer tienen un tamaño de 2245 y 3900 Da respectivamente por lo que se sabe que al menos ciertos péptidos deben de seguir otra vía. A diferencia de la ruta transcelular, si se ha demostrado que la vía paracelular está implicada en el transporte de péptidos de gliadina a la lámina propia mediante transcitosis. Estos ensayos se han llevado a cabo tanto *in vivo* en pacientes celíacos, como *in vitro* con células epiteliales intestinales. Matysiak-Budnik *et al.* (2003) demostraron que, en individuos sanos y en pacientes celíacos tratados, aquellos péptidos que han escapado a la digestión completa por las enzimas digestivas pueden ser captados y degradados por los enterocitos. Sin embargo, observaron que en los pacientes celíacos activos péptidos como el 19-mer o el 33-mer eran transportados unidos a IgA a través de los enterocitos y llegaban prácticamente intactos a la lámina propia. Estos datos junto con los obtenidos a partir de otros ensayos realizados *in vitro*, apuntan a que la llegada a la lámina propia de los péptidos de gliadina ocurre por la ruta transcelular (Schumann *et al.*, 2008; Barone *et al.*, 2010; Zimmer *et al.*, 2010).

Una vez atravesada la barrera epitelial, estos péptidos son desaminados por la TGt, reconocida como el autoantígeno de la EC (Dieterich *et al.*, 1997; Schuppan *et al.*,

1998). La TGt es una enzima que se activa tras una lesión tisular y que posee alta afinidad por determinadas regiones ricas en glutamina presentes en los péptidos derivados de la digestión del gluten. La acción de la TGt sobre los péptidos del gluten va a resultar en la desaminación de ciertos residuos de glutamina, generándose residuos de ácido glutámico, que poseen carga negativa. Esta carga negativa es la que va a favorecer la unión de estos péptidos a las moléculas de HLA-DQ2/8 que están expuestas en la superficie de las células presentadoras de antígeno (Vader *et al.*, 2002). Tras la unión de los péptidos desaminados a los heterodímeros, estos quedan expuestos al reconocimiento por linfocitos T CD4+ restringidos por HLA-DQ2 y/o DQ8 en la lámina propia, produciéndose la activación de los mismos. Una vez que los linfocitos T se encuentran activados, van a promover la activación de células B productoras de anticuerpos anti gliadina y anti TGt, además de la producción de distintas citoquinas entre las que se incluye el interferón- γ . La acción conjunta de todas estas moléculas producidas, va a resultar en el daño tisular característico de la EC (Kagnoff, 2007) (Figura 5).

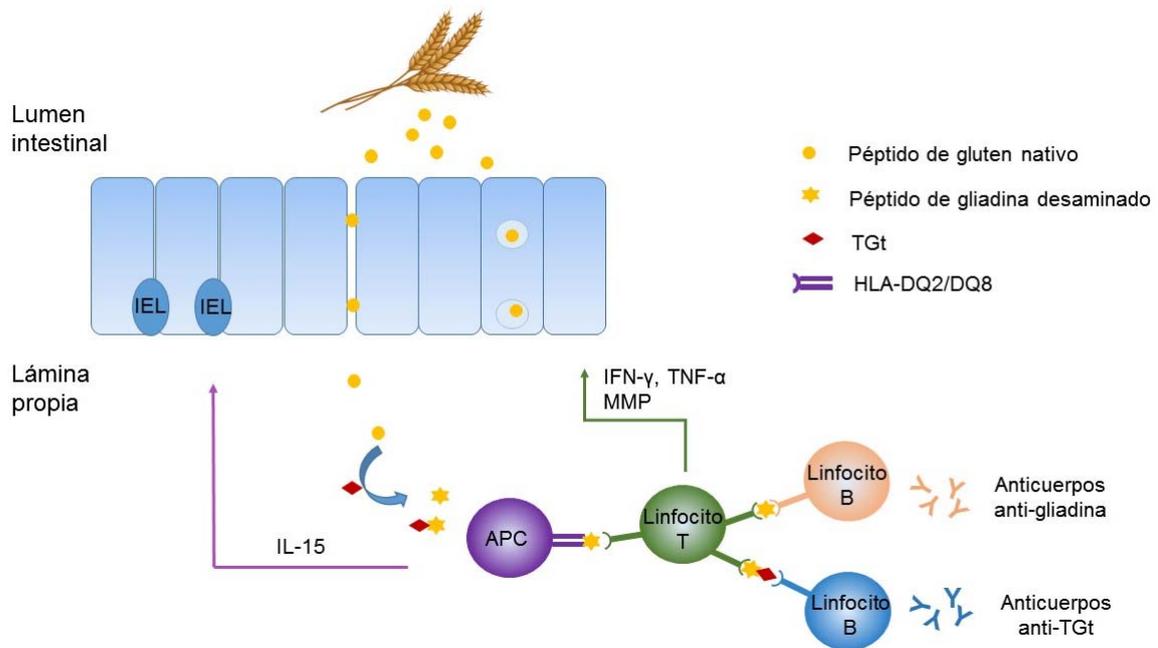


Figura 5. Proceso patológico de la EC. Los péptidos de gluten con alto contenido en prolina y glutamina se acumulan en el lumen intestinal y van a acceder a la lámina propia bien mediante la ruta paracelular por una permeabilidad aumentada, o bien mediante la ruta transcelular. En la lámina propia la TGt desamina residuos de glutamina convirtiéndolos en ácido glutámico con carga negativa lo que aumenta la afinidad del HLA-DQ2/DQ8 por los péptidos. Ciertos péptidos considerados tóxicos pueden desencadenar la respuesta inmune innata, en la que las APCs producirían moléculas proinflamatorias como IL-15. Otros péptidos como el 33-mer desencadenan la respuesta inmune adquirida. Estos péptidos una vez unidos a HLA-DQ2/DQ8 son presentados por las APCs a los linfocitos T que se activan y van a producir citoquinas proinflamatorias como IFN- γ o TNF- α , y metaloproteasas. A su vez van a activar a los linfocitos B que van a producir de forma específica anticuerpos frente al gluten o frente a la TGt. El conjunto de citoquinas proinflamatorias, metaloproteasas y anticuerpos producidos van a ser los responsables de la degradación de la mucosa y del aumento de los linfocitos intraepiteliales (IEL).

2.5. Tratamiento actual y su problemática

El único tratamiento seguro que está aceptado a día de hoy consiste en llevar a cabo una DSG de por vida. Esto implica llevar una dieta muy restrictiva, ya que el enfermo debe eliminar de la dieta no solo aquellos alimentos que contengan trigo, sino también aquellos que contengan cebada, centeno o cereales relacionados. Además, hay que tener en cuenta que por las propiedades que le confieren las prolaminas, el gluten es un aditivo muy común en numerosos alimentos incluyendo embutidos, yogures, conservas, helados, etc (Makharia, 2014) por lo que los individuos celíacos deben tener especial cuidado al ingerir cualquier tipo de alimento, aunque su base nutricional no sea un cereal. Además de la ubicuidad del gluten hay otros factores que dificultan el cumplimiento de esta dieta como son la contaminación cruzada de alimentos y el etiquetado inadecuado de los mismos. Es frecuente que un paciente que esté realizando una DSG, en realidad esté consumiendo de forma inadvertida pequeñas trazas de gluten que podrían estar presentes bien en los propios alimentos, o bien en superficies como puede ser la vajilla empleada para comer (Francavilla *et al.*, 2014). Además este tratamiento puede tener un impacto negativo en la calidad de vida del paciente celíaco, pudiendo producir un estrés psicológico, económico y social (Caputo *et al.*, 2010). Estudios nutricionales han mostrado que la DSG también puede acarrear deficiencias en micronutrientes tales como el hierro, calcio, magnesio, cinc, vitamina D, vitamina B12, ácido fólico, etc (Kupper, 2005). 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 (McAllister y Kagnoff, 2012). Por lo tanto, aunque una DSG es segura y efectiva para la mayoría de los pacientes celíacos, la presencia de las complicaciones citadas con anterioridad hace necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos, o al menos complementarios para la EC.

2.6. Tratamientos alternativos

El desarrollo patológico de la EC es un proceso complejo en el que tienen que sucederse una serie de eventos para que se desarrolle la enfermedad. Esto ha permitido la búsqueda de tratamientos con múltiples enfoques y niveles de actuación (Figura 6).

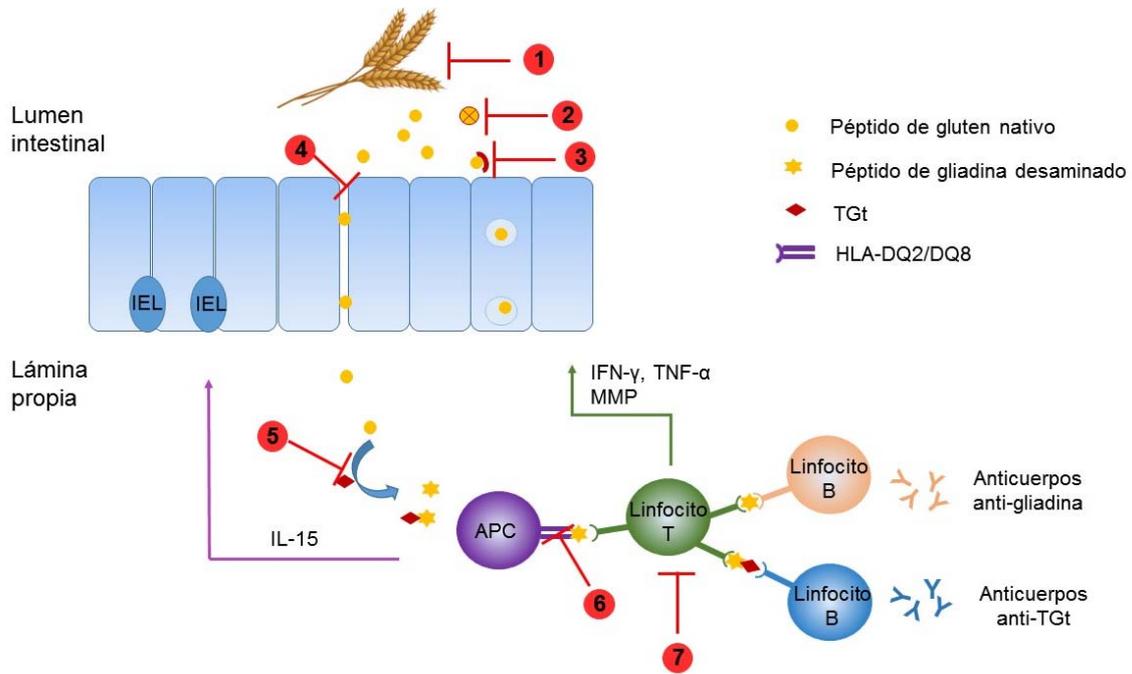


Figura 6. En esta imagen se muestran algunos de los tratamientos propuestos alternativos a la DSG. (1) Reducción de toxicidad del gluten ex vivo; (2) Terapia oral con proteasas para hidrolizar los epítopos tóxicos del gluten; (3) Uso de copolímeros que secuestran el gluten; (4) Disminución de la permeabilidad celular; (5) Inhibición de la TGt; (6) Bloqueo de HLA-DQ2/DQ8; (7) Modulación de la respuesta inmune bien por el uso de probióticos, bien por inducción de la tolerancia oral.

2.6.1. Reducción del gluten ex vivo

El gluten es el desencadenante de la EC, por lo que una de las formas de abordar el problema sería reducir la exposición a esta proteína.

Con este fin se han propuesto dos alternativas. Una de ellas sería la creación de cultivos genéticamente modificados que carezcan en la medida de lo posible de los epítopos tóxicos. Aunque pueda parecer sencillo, llevar a cabo este proyecto supone un gran desafío, ya que el gluten contiene un gran número de estos epítopos y además se encuentran situados en distintos *loci* genéticos (Makharia, 2014).

La otra alternativa se basa en el pretratamiento del gluten antes de su ingesta con proteasas bacterianas o fúngicas. Se ha visto que ciertas cepas de lactobacilos cuando son añadidas a la masa madre durante el proceso de fermentación, son capaces de hidrolizar los péptidos del gluten ricos en prolina y glutamina, reduciendo su inmunotoxicidad. Rizzello *et al.* (2007) comprobaron que podía reducirse el contenido en gluten hasta alcanzar un valor de 10 ppm, inferior a los 20 ppm que se considera el límite de seguridad para los enfermos celíacos.

Estas alternativas permitirían evitar alguno de los problemas que acarrea la DSG como la deficiencia nutritiva, pero hay que tener en cuenta que los problemas sociales y económicos seguirían existiendo ya que los pacientes celíacos deberían seguir llevando a cabo una dieta especial.

2.6.2. Terapia oral

El gluten, a diferencia de otras proteínas de la dieta, es resistente a la digestión total por las enzimas gastrointestinales. Como consecuencia de esta digestión incompleta, se van a generar péptidos de alto peso molecular ricos en prolina y glutamina, que van a desencadenar la respuesta inmune característica de la EC. Por eso uno de los tratamientos alternativos que se postulan es la administración oral de proteasas que hidrolicen los epítomos tóxicos del gluten.

Las enzimas más estudiadas por su capacidad de romper enlaces en los que participa la prolina son las PEPs. Estas enzimas que pertenecen a la familia de las serín proteasas, han sido descritas tanto en microorganismos como en plantas, y fueron propuestas por primera vez para destoxificar el gluten *in vivo* por Shan *et al.* (2002).

Para poder ser empleadas en terapia oral, estas proteasas no solo deben hidrolizar los péptidos inmunotóxicos del gluten, sino que idealmente deben cumplir otra serie de requisitos. El primero de ellos, es que estas enzimas deben resistir el pH ácido del estómago. Además deben ser capaces de hidrolizar la mayor parte del gluten en ese ambiente ácido, minimizando su exposición en el duodeno. Por último, las PEPs deben ser resistentes a la digestión por las enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal (Caminero *et al.*, 2014b).

Actualmente existen varias PEPs de microorganismos descritas como son las aisladas de *Flavobacterium meningosepticum* (FM-PEP) o *Myxococcus xanthus* (MX-PEP) (Shan *et al.*, 2004). Aunque estas enzimas mostraron destoxificar eficazmente el gluten, eran inactivadas al pH ácido del estómago (Freeman, 2015). En otros casos detallados a continuación las enzimas han cumplido todos los requerimientos necesarios, y se encuentran en una fase de estudio avanzada.

- AN-PEP

El ingrediente activo de AN-PEP es una PEP producida por el hongo *Aspergillus niger* que ha sido formulada por la multinacional holandesa DSM. Estudios *in vitro* han mostrado que la enzima es activa a pH entre 2 y 8 con actividad óptima a pH entre 4 y 5, y además es capaz de digerir la gran mayoría del gluten antes de que este llegue al intestino delgado. AN-PEP resiste la acción de la pepsina, y ha sido capaz de degradar todos los péptidos del gluten analizados hasta el momento (Mitea *et al.*, 2008). Un estudio reciente en el que se compara la AN-PEP con varios suplementos enzimáticos comercializados actualmente para ayudar a la digestión del gluten en pacientes celíacos, pone de manifiesto la alta efectividad *in vitro* de esta enzima (Janssen *et al.*, 2015).

Basándose en el éxito de estos ensayos *in vitro*, se han llevado a cabo varios ensayos clínicos. El último de ellos, un ensayo clínico de doble ciego en Fase II llevado a cabo con pacientes celíacos, demostró que AN-PEP es segura y bien tolerada, pero no se pudo demostrar su eficacia ya que el grupo suplementado con placebo no mostró un empeoramiento significativo.

- ALV003

ALV003 ha sido desarrollado por Alvine Pharmaceuticals Inc; es un compuesto formado por la mezcla de dos glutenasas: ALV001 y ALV002. ALV001 es una endoproteasa específica de glutamina presente en la semilla de la cebada (EP-B2) mientras que ALV002 es una PEP que deriva de la bacteria *Sphingomonas capsulata* (SC-PEP). Ambas enzimas han mostrado ser activas en el ambiente ácido del estómago, y se ha visto que combinadas en proporciones 1:1 tienen un efecto mayor sobre el gluten. (Gass *et al.*, 2007a). Los dos últimos ensayos clínicos completados hasta la fecha fueron de Fase IIa y han sido publicados por Lähdeaho *et al.* (2014). En estos ensayos de doble ciego, durante seis semanas los dos grupos de pacientes adultos celíacos consumieron de manera aleatoria ALV003 o un placebo, junto con 2 g de gluten/día. Aunque los dos grupos no mostraron diferencias significativas en cuanto a los síntomas, el estudio concluyó con éxito. La comparación de las biopsias duodenales antes y después del estudio permitió determinar que ALV003 sí produce una mejora del daño causado por el gluten en el intestino delgado.

Actualmente se está llevando a cabo un estudio clínico en Fase IIb para evaluar la seguridad y la eficacia de distintas dosis de ALV003 en 500 pacientes celíacos que muestran síntomas a pesar de estar siguiendo una DSG (Gottlieb *et al.*, 2015).

Hay que tener en cuenta que aunque estos estudios son prometedores, la eficacia de estas enzimas solo ha sido demostrada para eliminar pequeñas cantidades de gluten. Para que un paciente celiaco pudiera ingerir una dieta normal (20 g de gluten/día), deberían administrarse altas cantidades de enzima, y además el tiempo de actuación de las PEPs debería ser mayor. No obstante, estas enzimas podrían ser empleadas como coadyuvante a la DSG para eliminar los efectos causados por la ingesta inadvertida de pequeñas cantidades de gluten. En cualquier caso, existen varias líneas de investigación abiertas que siguen centrándose en la búsqueda de enzimas que hidrolicen el gluten, o en el estudio de efectividad de aquellas ya existentes. La última enzima propuesta este mismo año (2015) ha sido la α -triticína, una cisteín proteasa del trigo con actividad glutenásica y colagenásica (Savateeva *et al.*, 2015).

2.6.3. Probióticos

Otro método para 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 ejercer un efecto protector frente a 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 (Medina *et al.*, 2008; Cinova *et al.*, 2011; Olivares *et al.*, 2012; Laparra *et al.*, 2013; Olivares *et al.*, 2014). Dentro del género *Lactobacillus*, se ha descrito que las especies *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, así como *Lactococcus lactis* tienen un efecto inmunomodulador en el intestino (D'Arienzo *et al.*, 2008; Huibregtse *et al.*, 2009).

Una de las preparaciones probióticas más conocidas es VSL#3; una mezcla de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias que ha demostrado ser capaz de hidrolizar por completo los péptidos p62-75 y 33-mer de la α -gliadina. Además se ha visto que este preparado probiótico es capaz de estabilizar las uniones intraepiteliales promoviendo el efecto barrera que impide la entrada de péptidos tóxicos a la lámina propia (De Angelis *et al.*, 2006).

2.6.4. Bloqueo del gluten por copolímeros

Otro enfoque terapéutico distinto aunque poco estudiado es el uso de copolímeros para secuestrar el gluten en el lumen intestinal. Pinier *et al.* (2012) observaron que el polihidroximetilmetacrilato-co-estireno sulfonato [P(HEMA-co-SS)] forma de manera específica un complejo con la α -gliadina y se ha demostrado que reduce su toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo murino.

Actualmente, la empresa BioLineRx ha desarrollado a partir de este compuesto un copolímero de sodio estireno sulfonato (SSNa) y 2-Hidroximetil metacrilato (HEMA) denominado BL-7010. Los resultados obtenidos de un ensayo clínico en Fase I/II han demostrado que la ingesta del polímero es segura y se tolera bien (Gottlieb *et al.*, 2015).

2.6.5. Disminución de la permeabilidad celular

El desarrollo de la EC podría verse favorecido por el aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal que se produce por una sobreexpresión de zonulina inducida por la presencia de gliadina. La empresa Alba Therapeutics ha desarrollado un fármaco, el larazotide acetato (AT-1001) que actúa bloqueando el receptor de zonulina (Paterson *et al.*, 2007). Hasta el momento, se han completado seis ensayos clínicos (tres en Fase I y tres en Fase II) en los que se ha demostrado que es seguro y parece mejorar la sintomatología, aunque no se han detectado cambios significativos en la permeabilidad celular (Kelly *et al.*, 2013; Freeman, 2015).

2.6.6. Bloqueo de la TGt

Una vez que los péptidos llegan a la lámina propia, por sí mismos no van a provocar una respuesta inmune. Sin embargo, una vez que estos péptidos son desaminados por la TGt, quedan cargados negativamente y se van a unir al complejo HLA-DQ2/DQ8 que se encuentra en la superficie de las células presentadoras de antígeno desencadenando la respuesta inflamatoria. Por esta razón, otro de los mecanismos para combatir la EC consistiría en el bloqueo bien de la TGt o bien de los complejos HLA-DQ2/DQ8. Aunque se han hecho algunos ensayos preliminares prometedores, ninguno se ha realizado *in vivo*, y se desconoce en profundidad los efectos nocivos que podría tener el bloqueo de estas moléculas en el ser humano (Molberg *et al.*, 2001; Maiuri *et al.*, 2005; Siegel *et al.*, 2007; Silano *et al.*, 2008).

2.6.7. Inducción de tolerancia oral

Aproximadamente el 1% de la población muestra intolerancia al gluten y desarrolla EC, por lo que parece lógico pensar que si tolerasen el gluten, los problemas asociados a su consumo desaparecerían. Para ello se ha propuesto la inmunización utilizando péptidos antigénicos capaces de generar células T reguladoras. Estas 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 (Larche y Wraith, 2005; Ali y Larche, 2005). Basándose en este tipo de terapias de desensibilización, la empresa ImmuSanT ha desarrollado Nex Vax2.

Nex Vax2 es una vacuna que emplea tres péptidos del gluten hipotéticamente capaces de inducir tolerancia en pacientes celíacos. Aunque se han llevado a cabo estudios en ratones que demuestran su eficacia y ensayos clínicos en Fase I que demuestran que es segura a corto plazo, quedan muchas cuestiones sin resolver como si es segura a largo plazo, si es realmente eficaz en humanos o si es capaz de crear tolerancia frente a los múltiples epítomos tóxicos que contiene el gluten (de Kauwe *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011; Makharia, 2014).

3. MICROBIOTA INTESTINAL Y METABOLISMO DEL GLUTEN

La primera vez que se describió la presencia de seres vivos en el tracto gastrointestinal fue en 1681, cuando Antonie van Leeuwenhoek informó de la presencia de “pequeños animales” en sus muestras de heces (Dobell, 1932). No fue hasta 1854 que Casimir Davaine describió por primera vez con detalle el cultivo puro de un microorganismo intestinal, el parásito *Pentatrachomonas hominis* (Hemmeter, 1902). Este estudio no tuvo un gran impacto pero sin embargo, el descubrimiento de la bacteria *Escherichia coli* por el pediatra alemán Teodor Escherich en 1885, despertó el interés científico por el estudio de la microbiota intestinal (Shulman *et al.*, 2007). Desde entonces, el número de microorganismos intestinales descritos, en especial del Dominio *Bacteria*, ha aumentado de manera considerable hasta las ~1000 especies que se conocen hoy en día. Los dos hechos más importantes que han permitido el avance en el estudio de la microbiología humana han sido la introducción en este campo de técnicas de cultivo completamente anóxicas (Hungate, 1969), y la introducción más reciente de técnicas moleculares (Rajilic-Stojanovic y de Vos, 2014).

3.1. Desarrollo y composición de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal humana está formada por trillones de microorganismos; diez veces superior al número de células que forman el cuerpo humano (Zhu *et al.*, 2010). Aunque estos microorganismos incluyen arqueas, bacterias, virus y eucariotas, las bacterias son el grupo mayoritario (Qin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015). Estudios de metagenómica indican que cada individuo alberga en su intestino al menos 160 especies bacterianas diferentes (Qin *et al.*, 2010). A pesar de las diferencias entre individuos, se ha demostrado que existe un *core* de bacterias que aparece representado en un alto porcentaje de individuos; 75 de las especies son comunes en >50% de los individuos, y 57 especies son comunes en >90% de los individuos (Tap *et al.*, 2009).

El proceso de colonización intestinal se inicia en el propio proceso del nacimiento. Se ha establecido que los niños que nacen de forma natural adquieren la microbiota vaginal e intestinal de la madre, que está dominada por géneros bacterianos como *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* o *Sneathia*. Sin embargo, aquellos que nacen por cesárea presentan mayor proporción de bacterias encontradas normalmente en la piel como son *Staphylococcus*, *Corynebacterium* o *Propionibacterium*. Inicialmente la microbiota del niño es inestable y poco diversa, pero con el paso del tiempo va evolucionando hasta mostrar a los 2-4 años de vida una microbiota más estable y similar a la de un adulto (Duda-Chodak *et al.*, 2015). Hay estudios que describen cómo en la primera semana de vida el intestino de un niño está habitado por enterobacterias, estreptococos, enterococos y estafilococos. El consumo de oxígeno gradual por estas bacterias, hace que se vayan estableciendo las condiciones anóxicas que favorecerán la implantación de los microorganismos anaerobios característicos del intestino como son los lactobacilos, bifidobacterias o bacteroides (Sakata *et al.*, 1985).

Los factores que condicionan el desarrollo de la microbiota son muy diversos, incluyéndose entre ellos el método de nacimiento, la lactancia materna, la toma de antibióticos, las infecciones bacterianas, el estrés o la dieta (Duda-Chodak *et al.*, 2015). En función de todos estos factores, cada individuo va a tener una microbiota única. Las interacciones que se producen constantemente entre la microbiota y el individuo hacen que el microbioma intestinal esté estrechamente relacionado con la salud del hospedador (Chow *et al.*, 2010).

La distribución de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal es muy variable (Figura 7). La presencia específica de cada una de las bacterias en las distintas regiones va a estar determinada por factores como el pH, los movimientos peristálticos, el potencial redox, la cooperación o antagonismo bacteriano, la secreción de mucina, la

dieta o la disponibilidad de nutrientes (Hao y Le, 2004). La densidad bacteriana va a ir aumentando desde 10^3 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL de secreción intestinal en el tracto superior hasta 10^{14} UFC/mL de secreción intestinal en el colon (Gasbarrini *et al.*, 2007). En la boca es más difícil estimar esta cantidad, pero se calcula que podría ser aproximadamente 10^{11} UFC/mL.

Es complicado determinar la microbiota de la cavidad oral, ya que está formada por distintas regiones anatómicas, y además está constantemente expuesta al ambiente externo. Zilberstein *et al.* (2007) realizaron un cultivo con muestras de saliva, raspado de lengua, y biopelícula tanto de la parte superior como de la inferior y determinaron que aunque la microbiota es muy diversa, los géneros mayoritarios en todas las muestras fueron *Streptococcus* y *Veillonella*, seguidos por otros menos representativos como *Lactobacillus*, en la saliva y la lengua, o *Propionibacterium* en la biopelícula.

Gran parte de las bacterias que se encuentran en el esófago son adquiridas por la ingesta de saliva (Zilberstein *et al.*, 2007). Por eso no es sorprendente que las bacterias encontradas con más frecuencia en el esófago pertenezcan a los géneros *Streptococcus*, *Veillonella* y *Prevotella* (Pei *et al.*, 2004). El estómago tradicionalmente se ha considerado que presenta una microbiota limitada debido a su bajo pH. Sin embargo Bik *et al.* (2006) determinaron la existencia de una comunidad más diversa en la que había representantes de los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria*. En individuos sanos se ha visto que las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia de la mucosa gástrica son *Veillonella* spp., *Lactobacillus* spp. y *Clostridium* spp. (Zilberstein *et al.*, 2007). Sin embargo, un estudio llevado a cabo en España mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo, encontró que las bacterias más abundantes en el estómago son *Propionibacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. y en menor medida *Staphylococcus* spp. (Delgado *et al.*, 2013).

A lo largo del intestino delgado, la distribución de la microbiota también es variable. La densidad bacteriana aumenta desde 10^4 UFC/g de contenido intestinal en el duodeno proximal hasta alcanzar 10^7 UFC/g de contenido intestinal en el íleon terminal (Rastall, 2004). Los estudios llevados a cabo sobre la microbiota del intestino delgado son escasos, debido a que se trata de una zona de difícil acceso para la toma de muestras.

La mayor parte de los estudios sobre la microbiota duodenal han determinado la presencia de bajas concentraciones de bacterias probablemente debido al pH ácido que presenta, a los movimientos peristálticos y a la secreción de jugos pancreáticos y ácidos biliares. Una gran parte de los microorganismos aislados del duodeno son bacterias ácido-tolerantes como los *Lactobacillus* y *Streptococcus*, aunque también se han

descrito en menor proporción bacterias de los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, enterobacterias y levaduras (Wilson, 2005). Otro estudio más reciente basado en técnicas de cultivo, describe cómo los géneros predominantes en individuos sanos son *Lactobacillus*, *Veillonella* y *Clostridium* (Zilberstein *et al.*, 2007).

El yeyuno e íleon están colonizados predominantemente por microorganismos aerobios gram negativos y algunos anaerobios obligados (Guarner, 2007). Wang *et al.* (2003) mostraron la presencia de *Bacteroidetes* y *Clostridium* como las especies dominantes en biopsias procedentes de la mucosa del íleon. En un estudio posterior, se determinó que *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y representantes del filo *Proteobacteria*, aparecían con frecuencia en biopsias procedentes del yeyuno (Wang *et al.*, 2005). Zilberstein *et al.* (2007) mostraron más recientemente mediante cultivo que las especies predominantes tanto en el yeyuno como en el íleon son *Bacteroides* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Veillonella* spp.

El colon es la región del tracto gastrointestinal donde mayor número y diversidad bacteriana hay. Los factores que facilitan el desarrollo bacteriano son la elevación del pH hasta valores próximos a la neutralidad, la disminución de la concentración de ácidos biliares, y la baja motilidad que presenta. Esto hace que el tránsito a lo largo del colon sea lento y proporciona a las bacterias el tiempo suficiente para fermentar los sustratos disponibles derivados de la dieta o de las secreciones endógenas (Guarner, 2007; Zhu *et al.*, 2011). El ambiente reductor que presenta el colon tiene como consecuencia que a pesar de la enorme diversidad bacteriana que lo habita, el 99,9% de esta microbiota es anaerobia estricta (Hao y Le, 2004). Dentro de la microbiota comensal del colon, el género *Bacteroides* es uno de los más abundantes (Tannock, 1995). Otros microorganismos abundantes pertenecen a los géneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* o *Clostridium* (Conway, 1995). En menor proporción también se han descrito bacterias anaerobias facultativas o aerotolerantes como enterobacterias, enterococos, lactobacilos y estreptococos (Hagiage, 1993; Wilson, 2005).

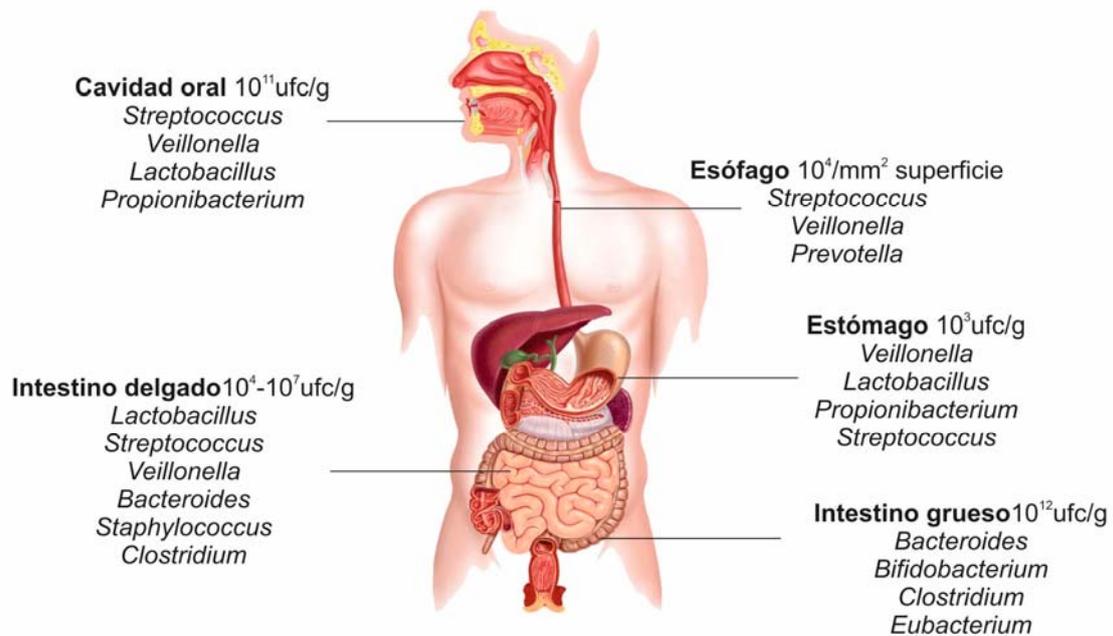


Figura 7. Distribución de la microbiota más representativa a lo largo del tracto gastrointestinal.

3.2. Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal y el hospedador mantienen una estrecha relación de simbiosis, en la que ambas partes se ven beneficiadas (Chow *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2014). Entre las funciones importantes para el hospedador en las que interviene la microbiota intestinal deben incluirse no solo la metabólica y la protectora, de las que hablaremos más en detalle, sino también otras menos conocidas como las de contribuir a la maduración del tracto gastrointestinal, participar en la regulación de la permeabilidad paracelular o regular la angiogénesis (Stappenbeck *et al.*, 2002; Hooper, 2004; Neu *et al.*, 2007). A cambio, las bacterias comensales van a aprovecharse del ambiente protector y nutritivo que les proporciona el hospedador (Tsuji *et al.*, 2008).

3.2.1. Función metabólica

Los genes codificados por los microorganismos intestinales representan en número más de 100 veces los genes presentes en el genoma humano (Tsai y Coyle, 2009; Carding *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Esta gran diversidad genética tiene como consecuencia la producción de diversas enzimas y rutas bioquímicas que son distintas

a las producidas por el ser humano. Las numerosas funciones metabólicas en las que participa la microbiota intestinal han hecho que se considere al conjunto de los microorganismos que la componen como un órgano más del ser humano (el microbioma), que es adquirido tras el nacimiento (O'Hara y Shanahan, 2006; Lievin-Le Moal y Servin, 2006).

Muchos alimentos ingeridos en la dieta no pueden 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 (Hooper *et al.*, 2002). Uno de los productos más importantes producidos por el metabolismo bacteriano son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico (Laparra y Sanz, 2010a). La importancia de estos ácidos grasos radica en que constituyen la fuente de energía 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. Por otro lado, el acético y el propiónico acceden a la circulación portal y participan en el metabolismo del colesterol y los lípidos (Topping y Clifton, 2001; Blaut y Clavel, 2007). Se ha descrito, que el ácido propiónico disminuye la expresión de enzimas lipogénicas en el hígado, implicadas en la síntesis *de novo* de triglicéridos y ácidos grasos, y reduce los niveles de colesterol (Hosseini *et al.*, 2011). Por el contrario, el acético reduce los niveles séricos de ácidos grasos, aunque aumenta los de colesterol (Teitelbaum y Walker, 2002). Se considera que globalmente la microbiota intestinal beneficiosa puede contribuir a reducir la colesterolemia mediante su capacidad para modular el equilibrio y composición entre estos AGCC.

Los AGCC favorecen también la absorción de minerales (calcio, magnesio y hierro) clínicamente relevantes para el tratamiento y prevención de ciertas enfermedades como la osteoporosis y la anemia. Esta absorción se produce como consecuencia de la reducción del pH luminal que aumenta la solubilidad de los minerales y favorece la entrada por difusión pasiva (Teitelbaum y Walker, 2002). Además, en la dieta se consumen sustancias como aditivos, fármacos, contaminantes, etc que pueden ser absorbidas. Estas sustancias llegan al hígado a través de la circulación sanguínea, donde son detoxificados por procesos de oxidación y conjugación. La mayoría de las sustancias extrañas son eliminadas por la orina pero otras moléculas son excretadas vía bilis, por lo que vuelven al lumen intestinal donde se encuentran con la microbiota

presente en el intestino. Muchas de estas sustancias son desconjugadas y detoxificadas por bacterias del intestino, permitiendo así su vuelta al torrente sanguíneo (van der Waaij, 1992).

Así mismo, el metabolismo bacteriano también va a estar implicado en la producción de vitaminas (K, B₁₂, biotina, ácido fólico y pantoténico) o en la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea (Hooper *et al.*, 2002).

Sin embargo, no toda la actividad metabólica de la microbiota intestinal ejerce un efecto positivo. De esta actividad metabólica se desprenden también algunas actividades potencialmente dañinas para el organismo. Aunque también está implicado en la producción de AGCC, el metabolismo anaeróbico de los péptidos y proteínas a nivel del intestino genera una serie de sustancias potencialmente tóxicas como amonio, aminas, fenoles, tioles e indoles (Macfarlane *et al.*, 1986; Hooper *et al.*, 2002).

3.2.2. Función protectora

Una de las funciones más relevantes de la microbiota humana es la regulación y estabilización del ecosistema, tanto intestinal como del resto de las mucosas, evitando la colonización por parte de microorganismos patógenos (Lievin-Le Moal y Servin, 2006). La microbiota comensal constituye una primera barrera de defensa frente a las infecciones. Los mecanismos mediante los cuales van a impedir la invasión de agentes patógenos son fenómenos de competición tanto por los nutrientes como por el espacio. Además, la microbiota intestinal va a producir compuestos como ácido láctico o bacteriocinas que va a restringir el crecimiento de otros microorganismos (O'Hara y Shanahan, 2006).

La microbiota intestinal no solo nos protege físicamente, sino que ejerce un papel esencial en el desarrollo del sistema inmunitario (Gronlund *et al.*, 2000; Noverr y Huffnagle, 2004). 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 o una baja concentración de inmunoglobulinas circulantes en la sangre (Butler *et al.*, 2000; Tannock, 2001). La inmadurez del sistema inmunitario de estos animales, demuestra que la microbiota intestinal podría actuar como un estímulo inmunogénico importante permitiendo la maduración del tejido linfoide asociado al tejido intestinal (Shroff *et al.*,

1995; Helgeland *et al.*, 1996). Dicha hipótesis queda demostrada cuando se induce experimentalmente la colonización bacteriana en estos animales y se comprueba la recuperación de la mayoría de los parámetros inmunitarios afectados por la ausencia de microorganismos (Hooper y Gordon, 2001).

3.3. Microbiota intestinal y enfermedad

Aunque cada día nuevos estudios aportan datos que nos ayudan a comprenderlo mejor, el papel que ejercen los microorganismos intestinales en la salud y en la enfermedad sigue siendo en gran parte desconocido. A pesar de la complejidad de esta microbiota, existe un balance delicado en las poblaciones bacterianas, que si se ve alterado puede producir un desequilibrio microbiano conocido como disbiosis (Pagliari *et al.*, 2015). Además de la EC de la que hablaremos en más detalle a continuación, la disbiosis de las comunidades bacterianas intestinales está relacionada con otras patologías como alergias, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, obesidad, diabetes e incluso cáncer (Zhang *et al.*, 2015).

La EC, al igual que la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn es una enfermedad que presenta datos de inflamación y lesión a nivel intestinal. En aquellos pacientes con colitis ulcerosa se ha descrito una disminución en las poblaciones de lactobacilos en la fase activa de la enfermedad, que aumentan de nuevo cuando la enfermedad se encuentra en fase de remisión (Bullock *et al.*, 2004). Estudios en un modelo de colitis ulcerosa de ratón mostraron que los animales en fase aguda de inflamación tenían una menor diversidad bacteriana y presentaban un número mayor de clostridios en el colon (Heimesaat *et al.*, 2007). El desarrollo de la colitis también se ha asociado a la mayor presencia de *E. coli* en el colon, o a la reducción de las bacterias *Roseburia hominis* y *Faecalibacterium prausnitzii* entre otros (Sokol *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015). Seksik *et al.* (2003) observaron que aquellos pacientes con enfermedad de Crohn tanto en forma activa como inactiva, tenían una microbiota fecal más rica en enterobacterias que los individuos sanos. Otro estudio llevado a cabo en un amplio grupo de niños relacionó el estado de la enfermedad de Crohn con un aumento de *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* y *Fusobacteriaceae* y una disminución en *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* y *Clostridiales* (Gevers *et al.*, 2014). Aunque existen varios estudios que aportan información sobre el papel que juega la disbiosis en el desarrollo de estas enfermedades, aún no hay un consenso sobre qué microorganismos son relevantes y de qué forma están implicados.

3.3.1. Microbiota intestinal y enfermedad celiaca

El hecho de que el gluten resulte inofensivo para la mayor parte de la población, incluyendo a aquellos individuos que presentan susceptibilidad genética, demuestra que otros factores ambientales diferentes al gluten podrían estar implicados en el desarrollo de la EC. Forsberg *et al.* (2004) mostraron por microscopía electrónica de barrido, unas bacterias bacilares ancladas en el duodeno de niños con EC, que no estaban presentes en individuos sanos. Este trabajo sugirió por primera vez el posible papel de las bacterias intestinales en la patogénesis de la EC. Desde entonces son varios los trabajos que han descrito un desequilibrio en la microbiota intestinal entre los pacientes celíacos y los individuos sanos.

- Microbiota duodenal y EC

La EC es una enfermedad que afecta al intestino delgado, por lo que a pesar de la dificultad que supone obtener las muestras, es lógico que los estudios se centren en estudiar la microbiota asociada a esta región.

Un estudio utilizando la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) mostró una reducción en la población de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como un incremento en la población de *Bacteroides* y *E. coli*, en las biopsias duodenales de niños celíacos con respecto a niños sanos (Nadal *et al.*, 2007). Posteriormente, Collado *et al.* (2008) y (2009) analizaron las heces y biopsias de niños sanos y celíacos mediante la técnica de PCR a tiempo real y mostraron que tanto en las heces como en las biopsias duodenales se veía un incremento de *Bacteroides* sp. y *Clostridium leptum* en los niños celíacos, mientras que *Bifidobacterium longum* se veía disminuida. También, establecieron que los niveles de *E. coli* y *Staphylococcus* fueron significativamente más altos en las heces y las biopsias duodenales de niños con EC activa con respecto a pacientes tratados y controles. Los datos obtenidos por Sanchez *et al.* (2010) son sin embargo contradictorios. Mediante la técnica de DGGE, observaron que había una reducción en la diversidad de *Bacteroides* en las biopsias de niños celíacos independientemente del tratamiento. De este modo, especies bacterianas como *Bacteroides distasonis*, *B. fragilis*, *B. uniformis* y *B. ovatus* aparecían más frecuentemente en controles sanos que en celíacos activos y tratados, mientras que *B. vulgatus* aparecía incrementado solo en sanos. En cambio, la diversidad de bifidobacterias era mayor en celíacos, presentándose las especies *Bifidobacterium adolescentis* y *B. animalis* más frecuentemente en pacientes celíacos activos que en sanos y celíacos en DSG.

En un estudio similar, llevado a cabo por Schippa *et al.* (2010), se analizó, mediante electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE), la composición de la microbiota asociada a la mucosa duodenal de niños con EC 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 mediante TTGE antes y después del tratamiento con la DSG. Recientemente, Sánchez *et al.* (2013) cultivaron la microbiota presente en biopsias duodenales de niños enfermos celíacos activos, tratados y controles no celíacos. A nivel de filo, concluyeron que en los niños que presentaban una forma activa de la enfermedad las proteobacterias eran más abundantes, mientras que con los firmicutes ocurría lo contrario. Más específicamente, encontraron que las especies *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus pasteurii* eran más abundantes en enfermos celíacos activos que en los controles. En cambio, especies pertenecientes a la familia *Streptococcaceae* aparecían de forma menos abundante en los enfermos celíacos. Por último, observaron una presencia mayor de *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus mutans* en controles, que en los dos grupos de enfermos celíacos.

Además de las diferencias en la composición de la microbiota duodenal entre sanos y celíacos, la actividad de esta microbiota también parece estar alterada. Bernardo *et al.* (2009) mediante zimografía, observaron que los pacientes celíacos tenían un perfil de proteasas bacterianas capaces de hidrolizar gliadina que estaba ausente en sanos. Este resultado muestra que además de un desequilibrio en la microbiota intestinal, los niños celíacos también presentan una actividad proteolítica de origen bacteriana diferente.

No obstante, no todos los estudios muestran diferencias claras entre la microbiota de niños sanos y celíacos. Ou *et al.* (2009) llevaron a cabo la caracterización de la microbiota de la parte proximal del intestino delgado mediante la secuenciación de una región del ADNr 16S y no encontraron diferencias en las poblaciones bacterianas entre las biopsias de niños con EC y niños sanos.

Todos estos trabajos realizaron un estudio descriptivo de la microbiota presente en el duodeno de niños sanos y celíacos. Sin embargo la EC no es una enfermedad que aparece únicamente en niños; hoy en día, se sabe que la EC puede ser diagnosticada a cualquier edad. Aunque la caracterización de la microbiota asociada a la EC en adultos también es importante, son pocos los trabajos enfocados a lograr este objetivo.

Nistal *et al.* (2012a) mediante la construcción de una colección de clones del ADNr 16S, caracterizaron la microbiota duodenal de niños y adultos no celíacos, celíacos activos y celíacos tratados. Los resultados 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.

Además de estos estudios enfocados a ver diferencias en la población general de bacterias entre sanos y enfermos tanto celíacos como tratados, en individuos adultos se han llevado a cabo otra serie de estudios más específicos. Lebba *et al.* (2013) mediante PCR a tiempo real empleando cebadores específicos de grupo, observaron que *Bdellovibrio bacteriovorus* está presente de forma significativa en biopsias duodenales de niños sanos y sin embargo, no aparece en casi ninguna biopsia de niño con enfermedad celíaca activa. Por último, con el fin de analizar si las diferencias en las poblaciones estaban no solo asociadas al diagnóstico sino también a la sintomatología, Wacklin *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio mediante DGGE y secuenciación del ADNr 16S. Los distintos grupos de estudio estaban formados por enfermos adultos celíacos que presentaban síntomas gastrointestinales, dermatitis herpetiforme o anemia, celíacos asintomáticos o controles (adultos con dispepsia). Esta investigación dio como resultado, una marcada diferencia en la diversidad y composición de la microbiota intestinal entre aquellos individuos enfermos celíacos con síntomas gastrointestinales clásicos, y aquellos con síntomas extraintestinales, lo que sugiere que la microbiota intestinal podría estar afectando o verse afectada por la forma en la que se manifiesta la EC.

- Microbiota fecal y EC

A pesar de que la EC afecta a la parte superior del intestino delgado, la facilidad en la obtención de muestras fecales frente a la toma de biopsias duodenales ha hecho que numerosos estudios se centren en analizar los cambios en la microbiota a nivel del intestino grueso. Además, aunque las poblaciones bacterianas en las dos regiones son diferentes, se ha demostrado que la microbiota fecal es capaz de reflejar una pequeña parte de la microbiota presente en el intestino delgado (Collado *et al.*, 2009).

Un método indirecto para estudiar la microbiota intestinal en las heces es mediante la cuantificación de los productos del metabolismo bacteriano. Tjellström *et al.* (2005) llevaron a cabo un estudio comparativo de la actividad metabólica de la microbiota fecal entre niños con EC y niños sanos. Este trabajo concluyó que los niños con EC, independientemente de la dieta, presentaban un patrón diferente de AGCC con respecto

a los niños sanos. Años después, Nistal *et al.* (2012b) observaron estos mismos resultados en adultos. El uso de diversas técnicas moleculares también ha servido para establecer diferencias en la composición de la microbiota fecal. Empleando la técnica de DGGE varios trabajos comparan los patrones de bandas generados por las muestras fecales de voluntarios sanos y pacientes celíacos. Nistal *et al.* (2012b) mediante DGGE y posterior análisis por UPGMA observaron cómo la microbiota de adultos sanos y de adultos con EC activa formaba dos clúster claramente diferenciados. Además, en una alta proporción de los adultos EC tratados se concluyó que la microbiota era restaurada a condiciones “normales”, ya que se agrupaban dentro del clúster de los individuos sanos. El patrón de bandas resultante del DGGE no solo mostró que los adultos celíacos activos presentan una microbiota diferente que los voluntarios sanos, sino que también existe un desequilibrio en el grupo de las bifidobacterias.

Otros estudios similares han mostrado diferencias en función del diagnóstico en niños. Sanz *et al.* (2007) 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*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*. El estudio llevado a cabo por Di Cagno *et al.* (2011) también mostró que los niños celíacos activos presentaban un desequilibrio tanto en la comunidad del género *Bifidobacterium* como en la de *Lactobacillus*.

Mediante FISH, Collado *et al.* (2007) determinaron que los niños con EC en comparación con niños sanos presentaban un número significativamente más alto de bacterias pertenecientes al grupo *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium histolyticum*, *Eubacterium rectale-C. coccoides*, *Atopobium* y bacterias reductoras de sulfato. Las bifidobacterias tendían a estar más elevadas en sanos, aunque las diferencias no fueron significativas. De Palma *et al.* (2010) corroboraron estos resultados, pero en este caso empleando cebadores específicos frente a los principales grupos de microorganismos de la microbiota intestinal. También observaron un incremento de bifidobacterias y una reducción de bacterias del grupo *Bacteroides-Prevotella* en niños sanos frente a niños con EC. De forma contradictoria al estudio anterior, observaron que *Clostridium histolyticum* era más abundante en sanos. De forma más general, observaron que los niños con EC activa o tratada mostraban un ratio de bacterias G+/G- significativamente más reducido que los niños control.

Aunque como vemos cada estudio de la microbiota fecal aporta unos resultados particulares, la gran mayoría, incluyendo los que aplican técnicas dependientes de

cultivo, parecen coincidir en una reducción de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos en enfermos celíacos (Golfetto *et al.*, 2014; Lorenzo-Pisarello *et al.*, 2015).

3.4. Metabolismo del gluten: microorganismos implicados

Las proteínas ingeridas en la dieta aportan al organismo los aminoácidos y el nitrógeno necesario para llevar a cabo numerosas funciones metabólicas esenciales para el correcto funcionamiento del organismo (Tome, 2013).

Antes de que las proteínas de la dieta puedan ser asimiladas, estas tienen que ser hidrolizadas a su paso por el tracto digestivo hasta formar productos que puedan ser absorbidos por el organismo (Chung *et al.*, 1979). La mayor parte de las proteínas y oligopéptidos van a ser rápidamente degradados en el tracto digestivo humano, pero algunos de estos compuestos, tiene una estructura aminoacídica que le hace particularmente resistente a la hidrólisis. Este es el caso de las proteínas del gluten.

Siguiendo una dieta occidental típica se ingieren aproximadamente 100 g de proteína al día, de los cuales se estima que unos 20 g son gluten (Gass *et al.*, 2007b). Además, a este consumo de proteínas hay que sumarle las secreciones proteicas salivares y gastrointestinales (35 g/día aproximadamente) que también son metabolizadas (Ganapathy *et al.*, 2006).

- Cavidad oral

Aunque tradicionalmente se ha considerado que la digestión de las proteínas comienza en el estómago, hay trabajos enfocados en el metabolismo del gluten que demuestran que el primer contacto de las proteínas con enzimas hidrolíticas podría tener lugar en la cavidad oral. Helmershorst *et al.* (2010) observaron una actividad enzimática en la cavidad oral capaz de digerir distintos péptidos del gluten. Posteriormente, aislaron los microorganismos tanto de la saliva como de la placa dental, y observaron que varios de ellos producían proteasas que reconocían tripéptidos comunes en las regiones inmunogénicas de las gliadinas. Además, algunos de estos microorganismos eran capaces de hidrolizar *in vitro* el 33-mer. Las cepas que presentaron mayor interés fueron *Rothia mucilaginosa* y *Rothia aerea*. Otras bacterias orales que mostraron estar implicadas en el metabolismo del gluten fueron *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sp*, *Neisseria mucosa* y *Capnocytophaga sputigena* (Fernandez-Feo *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014).

- Estómago

A pesar de que la microbiota de la boca ejerce una actividad proteolítica, la hidrólisis proteica tal y como la entendemos comienza en el estómago gracias a la acción de la pepsina. Esta enzima es secretada al estómago en forma de pepsinógeno, y una vez allí, es activada por el pH ácido de este compartimento (Ganapathy *et al.*, 2006). La activación de esta enzima inicia la digestión de las proteínas en el estómago generando productos proteicos parcialmente digeridos que llegan al intestino delgado (Roberts, 2006). Varios estudios realizados *in vitro* han mostrado que el estómago solo es capaz de hidrolizar parcialmente las proteínas del gluten, por lo que van a llegar al duodeno péptidos de gluten de elevado peso molecular (Frazer *et al.*, 1959; Shan *et al.*, 2002).

- Intestino delgado

En el intestino delgado tiene lugar la mayor parte del proceso hidrolítico de las proteínas (Hausch *et al.*, 2002). Cuando el contenido del estómago llega al intestino delgado, las células endocrinas del duodeno se estimulan por la bajada del pH y por la llegada del bolo alimenticio, secretando la hormona secretina y la 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 induce 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 (Ganapathy *et al.*, 2006; Whitcomb y Lowe, 2007). Las enzimas digestivas secretadas por el páncreas son la tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B. Estas enzimas son secretadas como precursores inactivos (tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasas). Una vez que la tripsina ha sido activada en el duodeno, es esta enzima la responsable de actuar sobre los demás zimógenos y activarlos. Las enzimas pancreáticas van a actuar a pH neutro digiriendo las proteínas de forma específica. 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. Posteriormente, las peptidasas del cepillo intestinal de los enterocitos van a digerir todos estos péptidos, generando dipéptidos, tripéptidos y aminoácidos libres. Estos productos de la degradación proteica van a ser transportados a través de distintos sistemas de transporte específicos al interior de los enterocitos, en el interior de los cuales hay peptidasas que actuarán sobre los dipéptidos y tripéptidos generando aminoácidos libres. Los aminoácidos libres son capaces de llegar a la circulación portal atravesando la membrana basolateral del

enterocito. A través de este proceso quedan complementados los requerimientos nutricionales de aminoácidos en el ser humano (Ganapathy *et al.*, 2006; Whitcomb y Lowe, 2007).

Es precisamente en el intestino delgado donde se produce la mayor diferencia entre la digestión del gluten, y las demás proteínas. Estudios *in vitro* han mostrado que las prolaminas del gluten son recalcitrantes a la digestión por las enzimas pancreáticas y del cepillo intestinal (Frazer *et al.*, 1959). La razón por la cual no pueden ser hidrolizadas completamente es que las prolaminas contienen un gran número de residuos de prolina, que protege a los péptidos frente a la hidrólisis. 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 (Matysiak-Budnik *et al.*, 2003; Matysiak-Budnik *et al.*, 2005; Robic *et al.*, 2011). Para hidrolizar enlaces peptídicos en los que participan residuos de prolina son necesarias enzimas con actividad prolilendopeptidásica, y las enzimas proteolíticas presentes en el tubo digestivo humano carecen de esta actividad (Tiruppathi *et al.*, 1993; Shan *et al.*, 2002; Hausch *et al.*, 2002). 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 ser dañinos para aquellos individuos susceptibles, y van a generar la respuesta inflamatoria característica de la EC (Shan *et al.*, 2002; Hausch *et al.*, 2002).

Aunque hasta la fecha no hay ningún estudio realizado *in vivo* que lo demuestre, hay varios trabajos que sugieren la participación de la microbiota del intestino delgado en el metabolismo de las proteínas. Ciertos estudios llevados a cabo con enterocitos aislados a partir de intestino delgado de cerdos parecen indicar que las bacterias del intestino delgado podrían estar catabolizando los aminoácidos libres que han sido generados tras la digestión proteica (Chen *et al.*, 2009; Davila *et al.*, 2013).

No solo se ha planteado la hipótesis de la posible participación bacteriana en el metabolismo de aminoácidos libres, sino que un estudio reciente llevado a cabo por Duar *et al.* (2015) demuestra de forma más directa, la participación de bacterias del intestino delgado en la degradación de péptidos completos. En concreto, el estudio se centra en la búsqueda de lactobacilos que estén implicados en la degradación de péptidos derivados de la digestión incompleta del gluten. Las bacterias objeto de estudio fueron aisladas del intestino delgado de cerdos alimentados con una dieta rica en gluten.

Mediante ELISA y espectroscopía de masas se buscó en las distintas cepas aisladas la presencia de una actividad proteolítica frente a alguno de los péptidos del gluten que son recalcitrantes a la digestión humana, y tóxicos para los enfermos celíacos (16-mer, 17-mer y 33-mer). Fruto de este análisis, se identificaron un total de cuatro especies de lactobacilos degradadores de péptidos del gluten: *L. amylovorus*, *L. salivarius*, *L. johnsonii* y *L. ruminis*. A pesar de que los cuatro microorganismos fueron capaces de degradar estos péptidos en mayor o menor medida, ninguno de ellos consiguió erradicar la presencia de los epítomos tóxicos en su totalidad. Se ha establecido que fisiológicamente el ser humano comparte muchas características con el cerdo, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo nos podrían orientar a lo que podría ocurrir en el intestino de humanos.

Nistal (2011) aisló los microorganismos crecidos a partir de cultivos de biopsias duodenales humanas en un medio que contenía gluten como fuente exclusiva de nitrógeno (MCG-1). En este medio, la microbiota asociada al cultivo de biopsias duodenales apareció dominada por *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* y *Escherichia coli*. Estos resultados fueron similares a los que se obtuvieron mediante PCR-DGGE y mediante la construcción de una colección de clones a partir del ADNr 16S. Además, cuando estos microorganismos fueron testados para ver si mostraban actividad proteolítica extracelular, se encontró que *S. hominis* y *S. epidermidis* eran capaces de degradar el gluten. Además *S. hominis*, *S. epidermidis* y *L. gasseri* hidrolizaban gelatina. Hasta donde conocemos, este es el único estudio realizado en humanos que muestra la presencia de bacterias duodenales capaces de metabolizar el gluten.

- Intestino grueso

A pesar de que el sistema digestivo humano es un sistema altamente eficiente, se ha descrito que una parte de las proteínas ingeridas en la dieta, incluidas las proteínas del gluten, son capaces de atravesar el intestino delgado y llegar al intestino grueso (Evenepoel *et al.*, 1998; Comino *et al.*, 2012; Caminero *et al.*, 2012). Una vez allí, la extensa y diversa microbiota del colon va a metabolizar estas proteínas con el fin de obtener nutrientes para su propio metabolismo. Los compuestos generados 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 (Davila *et al.*, 2013). Sin embargo, la detección de gluten parcialmente digerido en las muestras fecales de pacientes sanos y enfermos celíacos demuestra que, al menos una parte del gluten consumido en la dieta, es capaz

de atravesar el tracto digestivo y es excretado por las heces (Comino *et al.*, 2012; Caminero *et al.*, 2012).

La implicación de la microbiota del colon en el metabolismo del gluten ha sido estudiada más ampliamente que la del intestino delgado, debido principalmente a la facilidad de obtención de la muestra. Aunque la microbiota del colon podría reflejar una pequeña parte de la microbiota del intestino delgado, las diferencias fisiológicas y ambientales de los dos compartimentos son muy grandes como para poder establecer comparaciones. El colon presenta una mayor densidad y diversidad bacteriana, así como un ambiente más reductor y un pH superior al encontrado en el intestino delgado. Además carece de la secreción de bilis, que es un agente antibacteriano.

Se ha descrito que bacterias del grupo de las bifidobacterias aisladas de heces como *Bifidobacterium longum* CECT 7347, *Bifidobacterium animalis* IATA-A2 o *Bifidobacterium bifidum* IATA-ES2, así como cepas de *Bacteroides fragilis* podrían llevar a cabo la hidrólisis de péptidos del gluten (Sanchez *et al.*, 2010; Laparra y Sanz, 2010b; Laparra *et al.*, 2012). En un estudio posterior, Caminero *et al.* (2014b) caracterizaron por primera vez la microbiota fecal involucrada en el metabolismo del gluten. Empleando un medio con gluten como fuente principal de nitrógeno, aislaron 144 cepas a partir de muestras de heces humanas, que mostraron estar implicadas en el metabolismo del gluten. Los microorganismos aislados pertenecieron principalmente a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*. Además, se demostró la presencia de una intensa actividad proteolítica fecal de origen microbiano que era capaz de hidrolizar los péptidos inmunotóxicos del gluten, como el 33-mer. Entre las bacterias capaces de hidrolizar dicho péptido se encontraron especies de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

II. OBJETIVOS

La EC es una enfermedad en cuyo desarrollo se sabe que, además del gluten, debe de haber otros factores ambientales implicados. Se postula que la microbiota podría tener un papel fundamental y sin embargo, son pocos los estudios que analizan la microbiota del intestino delgado y aún menos los que lo hacen en individuos adultos. Además, la importancia de esta microbiota podría radicar en su funcionalidad y no en su identidad. Actualmente no hay ningún estudio que analice la relación de la microbiota duodenal con el metabolismo del gluten. Por otra parte, a día de hoy el único tratamiento disponible para los enfermos celíacos es llevar a cabo una DSG de por vida y cumplir con esta restricción no sólo es complicado, sino que a veces aun realizando esta dieta, se consumen trazas de gluten de forma inadvertida que impiden la mejoría de los pacientes celíacos. Aunque hay varios estudios enfocados a encontrar tratamientos alternativos o complementarios para solventar estos problemas, actualmente ninguno ha sido aceptado para el tratamiento de la EC.

Partiendo de estas premisas, los objetivos planteados en este trabajo fueron:

1. Estudio de las diferencias en la microbiota duodenal implicada en el metabolismo del gluten en función de la EC en celíacos activos, celíacos tratados con dieta sin gluten, familiares de celíacos con susceptibilidad genética e individuos sanos.
2. Caracterización fenotípica de la microbiota duodenal implicada en el metabolismo del gluten en función del diagnóstico.
3. Búsqueda de lactobacilos con potencial probiótico en el duodeno.
4. Búsqueda y caracterización de enzimas con actividad glutenásica a partir de la microbiota duodenal y ambiental.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. SUJETOS DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras biológicas utilizadas fueron explantes duodenales obtenidos mediante biopsia proporcionadas por el Dr. Santiago Vivas del Servicio de Gastroenterología Adulta y Pediátrica del Hospital de León. Todas las muestras fueron extraídas mediante endoscopia alta con biopsia de la 2ª-3ª porción duodenal y se almacenaron en una solución de suero salino hasta su procesamiento, el cual tuvo lugar en menos de 3 h tras la toma de muestra.

Se recogieron biopsias duodenales provenientes de individuos adultos que presentaban uno de los siguientes diagnósticos: pacientes con enfermedad celíaca activa antes de haber comenzado una dieta sin gluten (CA), pacientes celíacos tratados con dieta sin gluten durante más de 1 año, en los que se realizaba la biopsia para comprobar la evolución de la atrofia vellositaria (CT), familiares con un HLA-DQ susceptible a la EC (F) y familiares de celíacos sin susceptibilidad genética, que fueron considerados como sanos (S).

Al diagnóstico, todos los pacientes celíacos presentaban datos clínicos compatibles con la enfermedad, como serología positiva (anticuerpos antitransglutaminasa), genética positiva (HLA-DQ2/DQ8), y alteraciones histológicas en la mucosa de la biopsia duodenal. Al momento de la recogida de la muestra, todos los pacientes CA presentaban alteraciones de la mucosa y una serología positiva. Por el contrario, los pacientes CT presentaban recuperación de la lesión histológica (Marsh 1-0), además de serología negativa desde al menos un año. Los familiares de pacientes celíacos seleccionados eran todos adultos y padres y/o hermanos de sujetos con EC que no presentaban alteraciones histológicas tras la biopsia duodenal. Estos familiares se clasificaron en dos grupos en base a su susceptibilidad genética a presentar la enfermedad. Aquellos familiares que presentaban HLA-DQ2/DQ8 en las pruebas genéticas se englobaron en un grupo (F) y los que no lo presentaban en otro (S). A los familiares se les realizó la biopsia duodenal bien por presentar síntomas que sugerían que era necesario realizar la endoscopia, o bien por ofrecerse a formar parte del estudio a pesar de no presentar ningún síntoma.

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

Para el cultivo de la microbiota duodenal se incluyeron en el estudio 42 individuos adultos: 5 enfermos celíacos activos (rango de edad comprendido entre 25 y 44 años, edad media 35 años), 14 enfermos celíacos tratados (rango de edad comprendido entre 18 y 69 años, edad media 45 años), 16 familiares de celíacos DQ2+/DQ8+ (rango de edad comprendido entre 28 y 65 años, edad media 42 años) y 7 familiares de celíacos DQ2-/DQ8- considerados sanos (rango de edad comprendido entre 23 y 63 años, edad media 43 años) (Anexo I).

Para el estudio de la microbiota a nivel molecular mediante PCR-DGGE se incluyeron en el estudio 52 individuos adultos: 5 enfermos celíacos activos (rango de edad comprendido entre 25 y 44 años, edad media 35 años), 14 enfermos celíacos tratados (rango de edad comprendido entre 18 y 69 años, edad media 45 años), 26 familiares de celíacos DQ2+/DQ8+ (rango de edad comprendido entre 28 y 65 años, edad media 42 años) y 7 familiares de celíacos DQ2-/DQ8- considerados sanos (rango de edad comprendido entre 23 y 63 años, edad media 43 años) (Anexo I).

2. MEDIOS DE CULTIVO

- **MCG-1**

Este medio fue diseñado en nuestro laboratorio. Es un medio pobre que contiene gluten como única fuente de nitrógeno.

Componente	Cantidad
Gluten	30 g
Glucosa	20 g
Tween 80	0,1% (v/v)
CaCl ₂	0,05 g
ZnSO ₄	0,07 g
Buffer fosfato pH 6,5	1% (v/v)
Agua destilada	Hasta 1 L

Para su uso como medio sólido se añadió agar al 1,5%. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C. Para bioensayo se añadieron 15 g de gluten en lugar de 30 g y se añadieron 12,5 mL de medio por cada placa de 5,5 cm de diámetro. Una vez solidificado se hizo un pocillo en cada placa.

En aquellos casos en los que se estudió el crecimiento de los microorganismos o la actividad glutenásica a varios pHs, los tampones empleados fueron: Ácido cítrico/NaOH (pH 2-5), Tris/HCl (pH 6-7) y Glicina (pH 8-12).

Para ensayar la inhibición de metaloproteasas se añadió al medio EDTA 5 mM.

- **MCG-3**

Se empleó para el aislamiento y mantenimiento de la microbiota duodenal. Fue obtenido por la modificación del medio utilizado por Zamakhchari *et al.*, (2011) para la búsqueda de microorganismos degradadores de gluten en la cavidad bucal. Este medio contiene gluten como fuente principal de nitrógeno.

Componente	Cantidad
Gluten	20 g
Digerido de gluten*	0,5 g
Tampón fosfato pH 7	1% (p/v)
Glucosa	1 g
Piruvato sódico	1 g
Succinato sódico	0,5 g
Extracto de carne	1 g
Peptona de carne	1 g
Pirofosfato soluble	0,25 g
Vitamina K1	0,0001% (v/v)
Tiamina	0,001 g
Riboflavina	0,001 g
Biotina	0,001 g
CaCl ₂	0,05 g
ZnSO ₄	0,07 g
NaCl	5 g
CaOH ₂	0,15 g
L-Cys	0,5 g
L-Arg	1 g
Hemina	0,01 g
Agua destilada	Hasta 1 L

*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 h a 37 °C a pH ácido (pH 2) y agitación 180-200 rpm.

Para su uso como medio sólido se añadió agar al 1,5%. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

- **MSG-3**

Este medio es igual que MCG-3 pero eliminando el gluten y el digerido de gluten. Se empleó como método de selección en la caracterización de bacterias implicadas en el metabolismo del gluten.

- **MCGel**

Es igual que MCG-3 pero sustituyendo el gluten por gelatina, y el digerido de gluten por digerido de gelatina.

- **Medio LB (Luria-Bertani)** (Miller, 1972)

Se empleó como medio general para el crecimiento de *E. coli*.

Componente	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	Hasta 1L

Se ajustó el pH a un valor de 7,5. Para su uso como medio sólido se añadió agar al 2%. Se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121 °C.

- **Medio TB (Terrific Broth)** (Maniatis *et al.*, 1982)

Medio tamponado y enriquecido para la propagación de *E. coli*. Formulado específicamente para incrementar el rendimiento de ADN plasmídico obtenido de transformantes de *E. coli*.

Componente	Cantidad
Bacto triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL
Agua destilada	Hasta 0,9 L

Se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121 °C. Antes de su utilización, se mezcló con 100 mL de una solución estéril de KH_2PO_4 170 mM y K_2HPO_4 720 mM. Para su uso como medio sólido se añadió agar al 2%.

- **Medio MRS (de Man, Rogosa Sharpe) (de Man *et al.*, 1960)**

Este medio se empleó para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*.

Componente	Cantidad
Peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Polisorbato 80	1 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agua destilada	Hasta 1L

Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C. Para su uso como medio sólido se añadió agar al 1,6%.

3. MICROORGANISMOS Y ENZIMAS EMPLEADOS

Serratia marcescens CECT 846 fue cedida por el Área de Microbiología de la Universidad de León para poder llevar a cabo este estudio. Esta cepa fue obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

La enzima serrapeptasa fue comprada en Advanced Enzyme Technologies Ltd. Para su obtención se llevó a cabo una fermentación controlada de bacterias del género *Serratia*, que secretan al medio esta enzima en grandes cantidades. Se distribuye en forma de polvo. 2000-2600 U/mg.

4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

4.1. Aislamiento de microorganismos de biopsia

El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Se pasó la biopsia junto con el suero salino en el que se mantenía a un tubo estéril de 2 mL y se centrifugó a baja velocidad para recuperar todas las bacterias que pudiera haber en suspensión.
2. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 2 mL de medio MCG-3.
3. Se incubaron las biopsias a 37 °C durante 48 h a 100 rpm.
4. A partir de los cultivos de biopsia se realizaron diluciones seriadas 1/10 utilizando NaCl al 0,9%, hasta la dilución 10⁻⁶.
5. Se añadieron por duplicado 100 µL de cada dilución en placas de Petri con MCG-3 sólido. Se introdujo dentro de una jarra de anaerobios una de las réplicas junto con un sobre de ácido ascórbico para generar condiciones anóxicas y un indicador con resazurina, y la otra junto con un sobre de ácido ascórbico específico para generar condiciones microóxicas. Se incubaron a 37 °C durante 48 h.
6. Tras la incubación, se analizaron las distintas morfologías de las colonias crecidas en las dos condiciones y se hicieron siembras sucesivas en aislamiento con el fin de obtener un cultivo puro de cada una de ellas.

4.2. Mantenimiento de los microorganismos

Las cepas aisladas se conservaron a una temperatura de 4 °C, en placas de 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. El procedimiento empleado para almacenar las cepas a -80 °C fue el siguiente:

1. Se crecieron las cepas puras en medio MCG-3 sólido en las mismas condiciones en las que fueron aisladas.
2. Las células se recogieron directamente de la placa añadiendo 1 mL de glicerol al 40% que ejerce como protector de la membrana bacteriana.

3. Las cepas diluidas en glicerol se guardaron en el arcón de -80 °C.

4.3. Curvas de crecimiento

1. Se inoculó una colonia aislada en 10 mL de MRS líquido y se incubó a 100 rpm y 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 1-1,2.
2. Se añadieron 20 μ L de una dilución 1/5 a 180 μ L de MRS previamente añadido en placas de 96 pocillos.
3. La placa con los cultivos se incubó a 37 °C y se midió la DO_{600} en un lector de placas Genios Plus a lo largo de 72 h en intervalos de 1 h.

Como la DO del inóculo inicial no se ajustó a un valor exacto sino que se ajustó dentro de un rango, la absorbancia inicial no fue la misma en todos los casos. Para normalizar las curvas de crecimiento se representó el $\ln(DO/DO_i)$.

4.4. Lisado de los microorganismos

En todos los casos el procedimiento inicial a seguir fue el mismo:

1. Se inocularon 10 mL de MRS a partir de una colonia aislada.
 2. Se incubó a 100 rpm y 37 °C durante 24 h.
 3. 150 μ L de este cultivo se emplearon para inocular 50 mL de MRS.
 4. Este cultivo se incubó a 100 rpm y 37 °C durante 24 h. A continuación se siguieron los pasos específicos descritos en cada uno de los apartados.
- Lisis enzimática mediante lisozima
5. Se tomó una alícuota de 2 mL de cada uno de los cultivos y se centrifugó a 4000 xg durante 10 min.
 6. El pellet se lavó con 1 mL de NaCl 0,9% y se centrifugó a 4000 xg durante 5 min.
 7. Se añadieron al pellet 2 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, 0,1% Tritón X-100, 2 mg/mL lisozima). Como control negativo se tomó otra alícuota a la que solo se le añadió Tris-HCl 50 mM pH 8.

8. Ambas alícuotas se incubaron a 100 rpm durante 1 h a 37 °C.
- Lisis mecánica mediante molino de bolas
5. Se centrifugaron 50 mL de cada uno de los cultivos a 12000 rpm durante 10 min.
 6. El pellet se resuspendió en 30 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 25 mM.
 7. Se añadieron a las células esferas de 0,17 mm y se les sometió a dos pulsos de 40 s en un molino de bolas AG (B. Braun, Melsungen, Alemania) refrigerado con CO₂. Como control negativo se tomó otra alícuota del cultivo inicial y se le aplicó el mismo tratamiento excepto la disrupción mecánica.
- Lisis mecánica mediante sonicación
5. Se cogieron 5 mL del cultivo y se centrifugaron a 4000 xg durante 10 min.
 6. El pellet se resuspendió en 5 mL de NaCl 0,9% y se sonicó con un homogeneizador ultrasónico Sonifier B-12 (Branson, Danbury, Estados Unidos) a una amplitud del 70% con 5 pulsos de 30 s intercalados con 1 min de reposo en hielo para evitar el sobrecalentamiento. Como control negativo se tomó otra alícuota que no fue sonicada.

En todos los casos, la degradación de la pared celular se comprobó mediante siembra en placas de MRS y mediante microscopía 100X (Nikon ECLIPSE E400).

5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1. Extracción de ADN genómico de cultivos bacterianos

Se empleó el kit *SpeedTools Tissue DNA Extraction* (Biotools). El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

1. Las células se recogieron directamente de un cultivo puro en placa, añadiendo 200 µL de NaCl 0,9% y se recuperaron mediante centrifugación a 8000 xg durante 5 min.
2. Se pre-incubó la muestra con enzimas líticas. Se resuspendió el pellet en 180 µL de tampón: 20 mM Tris/HCl; 2 mM EDTA; 1% Tritón X-100; pH 8

suplementado con 20 mg/mL de lisozima. Se incubó a 37 °C durante 30-60 min.

3. Se añadieron 180 µL de tampón BT1 y 25 µL de proteinasa K. La muestra se mezcló con el vórtex de forma vigorosa y se incubó a 56 °C hasta obtener una lisis completa (1-3 h). Durante el período de incubación se mezcló ocasionalmente con el vórtex.
4. Se mezcló la muestra con el vórtex y se añadieron 200 µL de tampón BB3 de lisis. Se mezcló de nuevo con el vórtex de forma vigorosa (10-20 s) y se incubó a 70 °C durante 10 min. Se mezcló con el vórtex brevemente.
5. Se añadieron 210 µL de etanol (96-100%) al lisado y se mezcló bien usando el vórtex.
6. Se cargó el lisado en una columna. Se centrifugó 1 min a 11000 xg y se desechó el tubo con el filtrado. Tras este paso el ADN queda unido a la columna.
7. Se llevaron a cabo dos lavados de la membrana de sílica del filtro. En el primer lavado se añadieron 500 µL de tampón BBW, se centrifugó 1 min a 11000 xg y se desechó el tubo con el filtrado. En el segundo lavado se añadieron 600 µL de tampón BB5 y se centrifugó de nuevo 1 min a 11000 xg. Se desechó el tubo y el filtrado.
8. Para eliminar el etanol residual se colocó la columna en un tubo de 1,5 mL y se centrifugó durante 1 min a 11000 xg.
9. Para la elución del ADN puro se añadieron 100 µL de tampón BBE, precalentado a 70 °C, directamente en la membrana. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y seguidamente se centrifugó durante 1 min a 11000 xg. El eluido contiene el ADN puro de la muestra.
10. Una vez extraído el ADN se cuantificó la concentración de los ácidos nucleicos midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Biocompare). Este sistema permite medir la concentración de ADN expresada en ng/µL a partir de un volumen de muestra de 1,5 µL. Al mismo tiempo mide los ratios de absorbancia entre 230/260 nm y 260/280 nm que permiten evaluar la pureza del ADN obtenido.

5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método simple y muy sencillo, descrito inicialmente por Mullis y Faloona (1987), que permite la amplificación *in vitro* de fragmentos de ADN, mediante una serie de incubaciones a distintas temperaturas. Se empleó un termociclador de Biometra, modelo *TProfessional Gradient*.

Mediante esta técnica se amplificaron fragmentos de ADN codificante para el ARNr 16S. La región codificante del ARNr 16S es frecuentemente empleada para la identificación bacteriana, debido a que esta región presenta zonas hipervariables intercaladas entre regiones ampliamente conservadas (Anexo II).

La *rTaq* polimerasa se empleó para identificar las bacterias aisladas por cultivo de biopsias (oligos 27F-E939R), amplificar el ADN extraído de bandas escindidas del DGGE (oligos HDA1-HDA2) y amplificar el gen codificante de la serrapeptasa (oligos SmarF-SmarR). Las secuencias de los oligos empleados se muestran en la Tabla 3. Los componentes y sus concentraciones empleados en la reacción de PCR se muestran en la Tabla 4.

La reacción de PCR se inició con una desnaturalización a 94 °C durante 4 min, y a partir de aquí se llevaron a cabo 30 ciclos con las siguientes etapas: desnaturalización del ADN a 94 °C durante 30 s, hibridación de las cadenas de ADN a 42 °C (oligos 27F-E939R), 62 °C (oligos HDA1-HDA2) o 59 °C (oligos SmarF-SmarR) durante 30 s, y extensión durante 1 min a 72 °C. Tras los 30 ciclos de amplificación se mantuvo la muestra a 72 °C durante 7 min para completar la extensión de las cadenas. La reacción se mantuvo a 4 °C. Para amplificar el gen de la serrapeptasa se redujo el número de ciclos a 20 con el fin de evitar el mayor número posible de errores.

Tabla 3. Cebadores empleados para las reacciones de PCR.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
27F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	~900	42
E939R	CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC		
HDA1GC	GCclamp*-ACTCCTACGGG AGGCAGCAGT	~200	56 con GCclamp
HDA2	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC		62 sin GCclamp
SmarF	GAGTGGAAATCGAACCAATGC	1491	59
SmarR	CCGTTGCTGTGTTACACGAT		

GC-clamp*: GCCGCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCACGGGGGG

Tabla 4. 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 tampón PCR	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
ADN molde	20-50 ng	20-50 ng
<i>rTaq</i> polimerasa (5 U/ μL)	0,2 μL	0,04 U/ μL
Agua milli-Q	Hasta 25 μL	-

Para llevar a cabo la PCR previa al DGGE 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. Para llevar a cabo la reacción se emplearon los cebadores HDA1GC y HDA2 que presentan la peculiaridad de que uno de los oligonucleótidos porta una cola de GC en el extremo 5' (*GC-clamp*) (Tabla 3).

Los componentes y las concentraciones de los mismos empleadas en la reacción de PCR mediante el kit *iProof High-Fidelity Master Mix* se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes y concentraciones para la reacción de PCR-DGGE empleando el kit *iProof High-Fidelity Master Mix*.

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	1 μL	-
ADN molde	3 μL	20-50 ng
Agua milli-Q	Hasta 20 μL	-

El programa de PCR que se utilizó para este kit consistió en una desnaturalización inicial de 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s y a partir de aquí 30 ciclos con las siguientes etapas: desnaturalización del ADN a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 s, hibridación de las cadenas de ADN a 56 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, y extensión durante 30 s a 72 $^{\circ}\text{C}$. El programa de PCR finalizó con una extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. La reacción se mantuvo a 4 $^{\circ}\text{C}$.

5.3. Ligación del ADN en un vector

Se empleó el kit comercial *StrataClone PCR Cloning* (Stratagene). La ligación se preparó siguiendo las indicaciones del kit comercial:

1. Se mezclaron en orden las siguientes cantidades: 3 μ L del tampón StrataClone, 2 μ L del producto de PCR (5-50 ng), 1 μ L del vector StrataClone amp/kan.
2. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación se colocó en hielo. En este paso el fragmento de ADN queda insertado 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:

- 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.
- Porta los genes de resistencia a la kanamicina y a la ampicilina.
- Posee el origen de replicación monocatenario del fago f1.
- Presenta los sitios loxP que son reconocidos por la Cre recombinasa.
- Contiene el origen de replicación del pUC.

Este vector se comercializa como una mezcla de dos fragmentos de ADN. Cada uno de los cuales presenta en uno de los extremos la Topoisomerasa I covalentemente unida al vector 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 8).

5.4. Transformación de *E. coli*

Los productos de la reacción de ligación se transformaron en células comerciales químicamente competentes de *E. coli* (*StrataClone™ SoloPack® Competent cells*). Estas cepas fueron proporcionadas por el kit *StrataClone PCR Cloning* (Stratagene). Entre las características más destacables de estas células está la de presentar una deleción en el gen Z del operón *lac*, esto permite la selección por color de aquellos transformantes portadores de un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación. Además, son capaces 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 (ρ SC-A-amp/kan, Figura 8). Estas cepas bacterianas también son resistentes a la estreptomycin. El proceso de transformación se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit comercial *StrataClone* (Stratagene):

1. Se descongelaron las células competentes lentamente en hielo durante unos 5 min. Una vez descongeladas, se mezcló el contenido de ese vial con 1 μ L de la reacción de ligación. La mezcla se incubó en hielo durante 20 min y durante este período de incubación, se precalentó el medio LB a 42 °C.
2. Se dio un choque térmico a las células en un baño a 42 °C sin agitación durante 45 s. A continuación se enfrió rápidamente la mezcla en hielo durante 2 min.
3. Se añadieron 250 μ L de medio LB precalentado a la mezcla de reacción de transformación y se incubó a 37 °C con agitación (250 rpm) durante 60 min.
4. Se sembró una alícuota de cada transformación en placas de Petri con medio LB al que se había añadido X-Gal y como antibiótico de selección kanamicina.
5. Se incubaron las placas a 37 °C durante toda la noche.

Para llevar a cabo este protocolo se necesitaron los siguientes productos:

Kanamicina (kam): El stock de este antibiótico se preparó a una concentración de 50 mg/mL en agua milli-Q. Para la selección de bacterias portadoras del plásmido con resistencia a este antibiótico se añadió a una concentración de 50 μ g/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 μ g/mL.

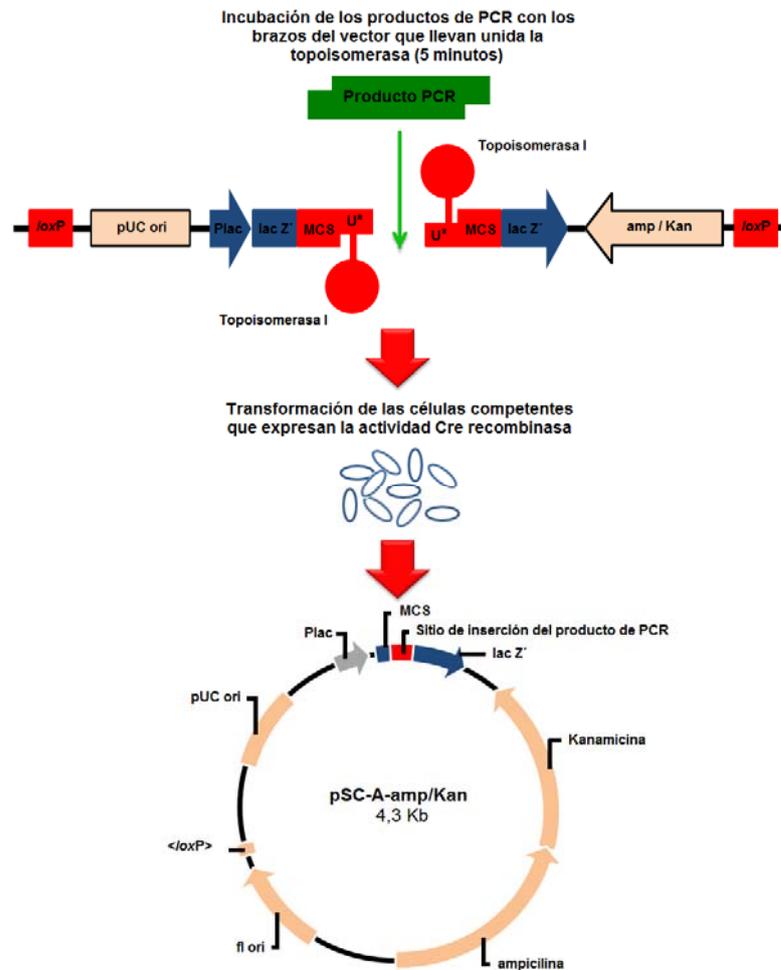


Figura 8. Mecanismo de acción del *StrataClone PCR cloning* (Stratagene).

5.5. Extracción del ADN plasmídico de *E. coli*: minipreparaciones

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

1. Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* en 1 mL de medio TB, suplementado con el antibiótico kanamicina. Después se incubó a 37 °C con agitación (250 rpm) durante al menos 6 h.
2. Se recogieron las células por centrifugación a 10000 rpm durante 2 min. El precipitado se resuspendió 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.
3. Se mezcló con el vórtex durante 1 min para que se resuspendiera bien el precipitado y seguidamente se hirvió durante 45 s. Las proteínas y el ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min.

4. Se eliminó el precipitado obtenido (restos celulares y ADN cromosómico) con un palillo estéril y el sobrenadante se precipitó 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 min.
5. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se lavó el precipitado resultante, que contenía los restos plasmídicos, con etanol al 70%. Se secó el precipitado y se resuspendió en 30 μ L de TE (Tris-EDTA). Se usaron 2 μ L del total para el análisis por digestión con endonucleasas de restricción.

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

STET: Sacarosa 8% (p/v), Tritón X-100 0,5% (v/v), Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 50 mM.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8.

5.6. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Una vez extraído el ADN plasmídico, para comprobar si la clonación había concluido con éxito se llevó a cabo una digestión con *EcoRI*, que reconoce dos puntos de corte en el vector utilizado en la ligación, liberando el fragmento clonado. *EcoRI* fue empleada siguiendo las recomendaciones del proveedor (Fermentas). Como norma general, el volumen de enzima añadido a la mezcla de digestión no debe 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:

1. Se mezclaron el tampón de la enzima de restricción (un 1/10 del volumen total de digestión), 2 μ L de ADN disuelto en tampón TE, 5 U de enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen de digestión.
2. Se incubó a la temperatura recomendada durante 2-3 h y se analizó el resultado de la digestión mediante electroforesis en geles de agarosa.

5.7. Purificación del ADN plasmídico

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

1. Se inoculó una colonia de un transformante de *E. coli* en 1,5 mL de medio TB suplementado con kanamicina y se incubó a 37 °C con agitación (250 rpm) durante un mínimo de 6 h. (Para conseguir una cantidad mayor de plásmido se empleó un cultivo de 3 mL).
2. Se centrifugó a la máxima velocidad (~16000 xg) durante 30 s. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo. Se eliminó cuidadosamente todo el sobrenadante con una pipeta.
3. El pellet se resuspendió en 200 µL de la solución I proporcionado por el kit utilizando el vórtex. El objetivo de este paso es el lisado de las células.
4. Se añadieron a continuación 200 µL de la solución II de lisis y se mezcló inmediatamente por inversión (aproximadamente unas 5 veces) hasta que la solución era clara y viscosa (La reacción de lisis no debe de exceder más de 5 min).
5. El siguiente paso fue la neutralización. Se añadieron 400 µL de la solución III y se mezcló inmediatamente por inversión (~10 veces) hasta que el precipitado estaba totalmente homogeneizado para así asegurar un aislamiento del plásmido puro y de alto rendimiento. Se centrifugó a la máxima velocidad (~16000 xg) durante 4 min.
6. Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a una columna de purificación preparada y se colocó la columna en un tubo eppendorf (es importante evitar transferir restos celulares a la columna ya que pueden afectar a la pureza del plásmido). Se centrifugó a la máxima velocidad durante 30 s y se eliminó el filtrado.
7. Cuando se emplean cepas de *E. coli* que contienen el gen *EndA+* tipo silvestre es necesario realizar un lavado adicional con 400 µL de la solución III. Se centrifugó a la máxima velocidad durante 30 s y se desechó el fluido que pasó

a través de la columna. Este paso es necesario para eliminar nucleasas potenciales y contaminación de carbohidratos.

8. Se añadieron 400 μL de la solución de lavado etanólica y se centrifugó a la máxima velocidad durante 1 min. Cuidadosamente se descartó el fluido que pasó a través de la columna. Para eliminar todo resto de etanol se volvió a centrifugar durante 30 s.
9. Se transfirió la columna de purificación a un tubo eppendorf nuevo y se añadieron 100 μL del tampón de elución directamente en el centro de la columna. Se incubó durante 30 s y seguidamente se centrifugó a la máxima velocidad durante 30 s. El eluido se envió al servicio de secuenciación de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (descrito en el apartado 6).

5.8. Electroforesis en geles de agarosa

Las condiciones de electroforesis para separar moléculas de ADN en geles de agarosa se basan en las descritas previamente por Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook *et al.* (1989). Para la preparación del gel, se utilizó agarosa D1-electroendosmosis media (Pronadisa) a diferentes porcentajes (desde 0,8% hasta 2% dependiendo de los tamaños de los fragmentos a separar), y Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X como tampón para polimerizar la agarosa.

Las muestras de ADN que se cargaron en el gel se prepararon añadiendo tampón de carga 6X que permite dar densidad a la muestra y ver cómo avanza en el gel durante la electroforesis. Una vez cargadas en el gel, se desarrolló la electroforesis en tampón TAE 1X aplicando un voltaje aproximado de 5 V por cm^2 de la cubeta. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15-20 min. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en la doble hélice de ADN, permitiendo que este 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 los fragmentos de ADN que los componen:

- ***NIHindIII***: 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 pb.

• **/PstI**: 11509; 5080; 4649; 4505; 2840; 2577; 2454; 2443; 2140; 1980; 1700; 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: 10 mg/mL en agua.

5.9. Electroforesis en geles 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 relacionada con su secuencia nucleotídica. Se trata de geles de acrilamida con un gradiente creciente de urea-formamida. Como en una electroforesis convencional, las moléculas de ADN corren hacia el polo positivo, pero en este caso, 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 poliacrilamida. Las moléculas de ADN que se analicen por este sistema deben llevar adheridas en uno de sus extremos una secuencia rica en los nucleótidos G y C (*GC-clamp*) idéntica para todas ellas. De este modo, cuando el ADN se desnaturalice por efecto del gradiente, las dos hebras no llegarán a separarse totalmente y se detendrán (Figura 9). Esta técnica es capaz de separar moléculas de ADN que se diferencian en un solo nucleótido.

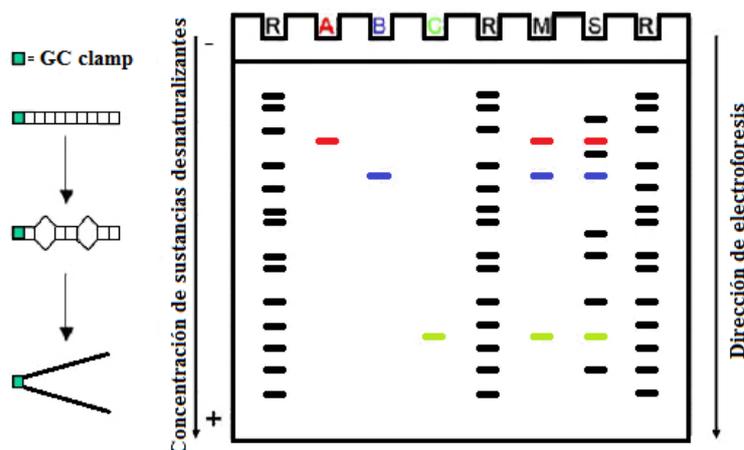


Figura 9. Esquema del fundamento de la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). Cuando el ADN se desnaturaliza queda atrapado en el gel. R: Perfil de referencia; A: Microorganismo 1; B: Microorganismo 2; C: Microorganismo 3; M y S: Muestras polimicrobianas procedentes de diferentes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

• Elaboración de los geles

La técnica del DGGE se basa en la separación de moléculas de ADN del mismo tamaño en base a su temperatura de desnaturalización. 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, que son los agentes desnaturalizantes, que van a hacer que el ADN se desnaturalice y deje de migrar.

El porcentaje de acrilamida empleado va a depender del tamaño del ADN amplificado que se quiera separar. En nuestro caso el tamaño de fragmento de ADN que se amplificó era de 200 pb. Utilizando la tabla de referencia incluida en el manual del *DCode Universal Mutation Detection System*, se eligió un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida al 30%.

La cantidad de urea y formamida de las soluciones del DGGE dependen del gradiente desnaturalizante que se quiere obtener en el gel. En la Tabla 6 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% ya que era el empleado en la bibliografía para bacterias no específicas.

Tabla 6. Volumen y cantidad de formamida y urea que es necesario añadir para soluciones desnaturizantes entre el 10% y 90% de acrilamida/bisacrilamida.

Solución desnaturizante	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	29	33,6	37,8

Los geles se elaboraron a partir de la combinación de dos soluciones desnaturizantes cuya composición se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes empleados en la elaboración de las soluciones desnaturizantes.

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 desionizada	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 15 min, 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 1,5 h a temperatura ambiente.

El gradiente del gel se preparó 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 tiene color (la solución con menor concentración de soluciones desnaturizantes no lleva tinte) y a medida que se desciende en el gel se va incrementando la coloración azul.

- 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 h a 70 V. El control de la temperatura es muy importante ya que también puede actuar como factor desnaturizante. El volumen de las muestras cargadas en el gel fue variable dependiendo de su concentración, añadiéndose el mismo volumen de tampón de carga 2X que de muestra de PCR (Tampón de carga 2X: Azul de bromofenol 0,05%; xileno cianol 0,05%; glicerol 70% y agua destilada hasta 10 mL).

Transcurrido ese tiempo el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/mL) durante 15 min y seguidamente se destiñó en TAE 1X durante 10 min dos veces consecutivas. Una vez teñido el gel se visualizó bajo un transiluminador y se fotografió (Quantityone, GelDoc).

- Extracción del ADN de bandas

A partir de los geles de DGGE, se seleccionaron aquellas bandas más intensas que aparecían a distintas alturas, y se extrajeron para identificar a qué microorganismos correspondían.

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

6. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

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-3 y las bandas generadas en el 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 Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing* (Amersham Pharmacia Biotech), de

acuerdo con las especificaciones indicadas por el fabricante, en un secuenciador automático (MEGABACE 500, Amersham Bioscience).

Las secuencias de ADN, una vez obtenidas, fueron editadas y revisadas con la ayuda de los programas informáticos *BioEdit* y *Editseq*. El alineamiento de las secuencias y el análisis filogenético de las mismas se llevó a cabo con el programa *MEGA* versión 5 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

El programa *BioEdit* (*Biological sequence alignment editor* para winXP, Tom Hall, Ibis Biosciences) 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*) y más concretamente el algoritmo BLASTN, que es específico para nucleótidos. De forma complementaria, para la identificación de las secuencias también se empleó el software *Ribosomal Database Project 10* (RDP).

Se realizó un alineamiento múltiple de todas las secuencias estudiadas junto con las secuencias de referencia obtenidas en la búsqueda con el BLASTN. Estos alineamientos permiten asegurar que las posiciones nucleotídicas comparadas son homólogas en todas las secuencias. El alineamiento se realizó utilizando el sistema *ClustalW* mediante el programa *MEGA* versión 5.

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*, 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*, 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.

7. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida y zimografía

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se elaboraron dos geles al 10% según lo descrito en la Tabla 8.
2. En cada pocillo se cargaron 30 μ L de una mezcla 1:1 muestra:tampón de carga 2X. Cuando fue necesario las muestras se concentraron empleando un Amicon® Ultra 15 mL. Como marcador se empleó el marcador de bajo peso molecular de BioRad.
3. La electroforesis se desarrolló a 100 V durante 2 h en tampón de electroforesis en un equipo *MiniProtean* (BioRad).
4. Una vez acabada la electroforesis, uno de los geles se tiñó con azul coloidal toda la noche, y se destiñó con agua milli-Q hasta ver las bandas de proteína sobre un fondo claro.
5. El otro gel se lavó 2x15 min con una solución de Tritón para eliminar el SDS, y después el Tritón se eliminó mediante 2x15 min de lavado en agua milli-Q. El gel se incubó 15 min en una solución de incubación. Una vez preparado, se puso en un recipiente estéril en contacto con una cobertera de gliadina (Tabla 8) y se mantuvo a 37 °C toda la noche.
6. Al día siguiente, se desechó el gel que había estado en contacto con la cobertera, y esta se tiñó con azul coloidal y destiñó con agua milli-Q de la misma forma descrita anteriormente. En este caso, lo que se observa son bandas claras producto de la hidrólisis de gliadina, sobre un fondo oscuro debido a la gliadina que contiene la cobertera.

Tabla 8. Composición de los geles de poliacrilamida.

	Gel separador		Cobertera	Stacking
	8%	10%	8%	
Agua destilada	3,8 mL	3,4 mL	3,8 mL	3,2 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 40%	1,4 mL	1,8 mL	1,4 mL	0,5 mL
Solución B	1,75 mL	1,75 mL	1,75 mL	-
Solución F	-	-	-	1,25 mL
SDS 10%	70 µL	70 µL	-	50 µL
APS 10%	50 µL	50 µL	50 µL	100 µL
TEMED	3,5 µL	3,5 µL	3,5 µL	5 µL
Gliadina	-	-	14 mg	-

Las soluciones necesarias tanto para la elaboración de los geles como para su procesamiento fueron:

Solución F: Tris/HCl 1,5 M pH 8,8.

Solución B: Tris/HCl 0,5 M pH 6,8.

Tampón de carga 2X: solución saturada de sacarosa 96,25 µL, solución F 93,75 µL, azul de bromofenol 1% 10 µL, SDS 10% 250 µL, agua destilada 50 µL.

Tampón de electroforesis: Tris 3 g/L, glicina 14,4 g/L, SDS 1 g/L.

Azul coloidal: Metanol 20%, Ácido ortofosfórico 40%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5%, coomasie G250 0,06%.

Solución de Tritón: solución al 2,5% de Tritón X-100.

Solución de incubación: Tris 6,06 g/L, ZnSO_4 1,44 g/L, CaCl_2 0,56 g/L pH 6,5.

7.2. Western Blott

Los ATIs fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Schuppan, donde fueron purificados siguiendo el protocolo descrito por Junker *et al.*, (2012). Los anticuerpos frente a las fracciones de los ATIs CM3 y 0.19 también fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Schuppan. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se crecieron las bacterias en 10 mL de LB durante 24 h a 37 °C. Posteriormente 150 µL de este cultivo se usaron para inocular 30 mL de LB.

Este inóculo se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5.

2. Se añadieron 50 μ L de ATIs a 950 μ L del cultivo (concentración final 2 μ g ATIs/ μ L cultivo). En el caso de la serrapeptasa, se añadieron 50 μ L de ATIs a 10 mg de la enzima disueltos en 950 μ L de LB.
3. Las muestras se siguieron incubando en las mismas condiciones, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. Cada una de las alícuotas se centrifugó a 16000 xg 10 min 4 °C y el sobrenadante se guardó a -80 °C hasta su uso. Como controles se añadieron:
 - 950 μ L LB + 50 μ L ATIs.
 - 950 μ L de cada cultivo o solución de serrapeptasa+ 50 μ L PBS.
4. Se mezcló 21 μ L de cada muestra (equivalente a 50 μ g de ATIs iniciales) con 1,2 μ L de ditioneitol (DTT) y 7 μ L de *Laemmli Sample Buffer* 4X (BioRad) y se incubó a 99 °C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas.
5. Se cargó cada una de las muestras en un pocillo de un gel de poliacrilamida al 10% (Tabla 8) y se desarrolló la electroforesis a 60 V durante 15 min y 110 V durante 1,5 h.
6. Transferencia semi-húmeda: el tiempo de la transferencia fue 30 min. Se usaron membranas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (BioRad).
7. Bloqueo: se incubó la membrana durante 1 h con agitación a temperatura ambiente en 50 mL de solución de bloqueo.
8. Incubación con anticuerpo primario: Se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario (anti-CM.3 o anti-0.19) diluido 1:1000 en TTBS. Se incubó toda la noche a 4 °C con agitación.
9. Lavados: se lavó 5x10 min con TTBS y con agitación.
10. Incubación con anticuerpo secundario: se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (*anti-rabbit* IgG) diluido 1:10000 en TTBS durante 1 h a temperatura ambiente.
11. Lavados: se lavó 6x10 min con TTBS con agitación.

12. Revelado: se añadió sustrato Immun-Star HRP (mezcla 1:1 de luminol y tampón peróxido) (BioRad) y se incubó 3 min a temperatura ambiente.
13. Se detectó la luminiscencia usando el Software Image Lab 3.0.
14. Para poder emplear un segundo anticuerpo sobre la misma membrana, se lavó la membrana con una solución de *stripping* durante 45 min a 50 °C. Posteriormente se lavó 3x10 min con PBS y 3x10 min con TTBS, y se procedió a repetir todos los pasos desde el bloqueo.

Las soluciones necesarias para realizar este protocolo son las siguientes:

TTBS: NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Tris base 3 g/L, Tween 0,05% (v/v), pH 7,5.

Solución de bloqueo: Leche descremada 5%, en TTBS.

PBS: NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,5.

Solución de *stripping*: SDS 20 g/L, Tris/HCl pH 6,7 1 M 6,25% (v/v), β-mercaptoetanol 0,7%.

8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

8.1. Actividad glutenásica y actividad gelatinásica

Para detectar las actividades glutenásica y gelatinásica los microorganismos se crecieron en MCG-1 y MCGel respectivamente, en las mismas condiciones en las que fueron aislados. La actividad glutenásica se observó directamente mediante la formación de un halo de degradación del gluten alrededor de la colonia que lo produce en medios de cultivo con gluten. Para revelar la actividad gelatinásica, fue necesario añadir a la placa ácido tricloroacético (TCA) 30%. Este ácido tiene la capacidad de precipitar las proteínas dando un color blanco al medio con gelatina. La hidrólisis se observó por la formación de un halo transparente alrededor de las colonias que poseían dicha actividad.

8.2. Actividad peptidolítica frente al 33-mer

La hidrólisis del péptido 33-mer se analizó mediante dos técnicas distintas: cromatografía e inmunoensayo.

- **Análisis mediante cromatografía**

El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Se incubaron 4,7 μL del péptido 33-mer a una concentración final de 60 μM con 3,4 μL de las muestras a analizar en PBS pH 7,3. El volumen final de reacción fue de 40 μL y la incubación se realizó a 37 °C durante 24 h de forma rutinaria.
2. A su vez, también se incubaron los siguientes controles:
 - Blanco: 60 μL de PBS.
 - Control negativo: 4,7 μL péptido 33-mer (60 μM) + 35,3 μL de PBS.
3. Una vez llevadas a cabo las incubaciones, se pararon las reacciones calentando las mezclas a 100 °C durante 10 min.
4. Se filtró por amicones con un tamaño de poro de 0,22 μm , centrifugándolos durante 2 min a 8000 rpm. Los eluidos se pasaron a viales de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) y se mantuvieron a 4 °C.
5. Las muestras se analizaron en un HPLC *Waters Alliance* utilizando una columna *Lichrospher 100 RP18* de 25 cm de longitud y 0,4 cm de diámetro (*Teknokroma SL*). Es una columna de fase reversa con un relleno esférico de 5 μm de partícula de carácter hidrofóbico (*Lichrospher*).

Las fases móviles que se emplearon fueron una fase móvil A con agua milli-Q + ácido trifluoroacético al 0,1% y una fase móvil B con acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 0,1%.

El volumen de inyección fue 10 μL y la técnica de inyección fue automática. El flujo se mantuvo durante todo el programa a 1 mL/min. La temperatura de la columna fue de 35 °C. El programa empleado se describe en la Tabla 9.

Tabla 9. Programa empleado para análisis de las muestras mediante HPLC.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
2	100	0
22	0	100
27	0	100
32	100	0
35	100	0

Se utilizó un detector PDA (*Photodiode Array*) 2998. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 215 nm. Para el análisis de los resultados se utilizó el software *Empower 2 Pro* (Waters 2005).

- **Análisis mediante inmunoensayo**

Para detectar la actividad peptidolítica del 33-mer mediante inmunoensayo se empleó el Kit ELISA *GlutenTox*. Este kit consiste en un ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) competitivo, que emplea el anticuerpo G12 que reconoce específicamente los epítomos tóxicos del 33-mer. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Se prepararon diluciones de las muestras a analizar con la solución de dilución proporcionada por el kit.
2. 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.
3. Se mezclaron 150 μ L del anticuerpo G12-HRP con 150 μ L 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 min a temperatura ambiente con agitación suave. En este punto es cuando el anticuerpo se une a la muestra de una manera proporcional a la cantidad de gluten presente en la mezcla.
4. En la placa de ELISA se colocaron el número necesario de tiras revestidas con gliadina y en ellas se añadieron 200 μ L 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 min. En esta parte los anticuerpos que no se unen a la muestra quedan retenidos en los pocillos revestidos con gliadina.

5. 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 μ L en todos los pocillos. Este proceso se repitió unas cuatro veces más hasta completar un total de cinco lavados. Después del último lavado se invirtió la placa y se golpeó suavemente hasta eliminar todo el líquido residual.
6. Se añadieron 100 μ L de la solución de sustrato proporcionada por el kit y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min protegido de la luz. Esta solución contiene el sustrato de la peroxidasa, junto con un cromóforo que se va liberando por 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.
7. Se añadieron 100 μ L de solución de parada en todos los pocillos para parar la reacción.
8. Se leyó la absorbancia en un lector de placas a una densidad óptica de 450 nm en el plazo máximo de 1 h.
9. 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 partes por millón (ppm) de gluten presentes en la muestra.

8.3. Actividad PEP

Las PEPs son endoproteasas pertenecientes a la familia de las serín proteasas, que tienen la capacidad de degradar los enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de residuos internos de prolina. El ensayo para determinar la actividad PEP de bacterias se realizó siguiendo el método fluorimétrico descrito por Goossens *et al.* (1992) con modificaciones:

1. Se añadieron 10 μL de la muestra a analizar en 100 μL de buffer fosfato 100 mM (pH 7,5) con EDTA 1 mM y DTT 1 mM preincubado a 37 °C. Para iniciar la reacción se añadieron 5 μL del sustrato fluorogénico N-benzoiloxicarbonil- glicil-prolil-7-amino-4-metilcumarina (concentración final 0,12 mM) (Bachem), disuelto en DMSO. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos oscuras con la base transparente.
2. La placa se incubó durante 120 min a 37 °C totalmente protegida de la luz y se paró añadiendo 50 μL de ácido acético 1 M.
3. 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.
4. Los valores de PEP se expresaron en unidades internacionales/mL de cultivo o unidades internacionales/g enzima. La unidad de actividad PEP se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de 7-amino-4-metilcumarina por minuto. Para ello se realizó previamente una curva estándar.

8.4. Actividad DPPIV

La DPPIV es una exoproteasa perteneciente a la familia de las serín proteasas que tiene la capacidad de degradar péptidos con residuos de prolina. 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. El ensayo para determinar la actividad DPPIV en heces se realizó utilizando el sustrato colorimétrico glicil-prolil-p-nitroanilina tosílada descrito por Nagatsu *et al.* (1976) y el protocolo descrito por Elgün *et al.*, (1999) con modificaciones:

1. Se añadieron 10 μL de la muestra a analizar en 100 μL de PBS 100 mM (pH 7,5) preincubado a 37 °C. Para iniciar la reacción, se añadieron 5 μL del sustrato cromogénico glicil-prolil p-nitroanilina tosílada (concentración final 3 mM) (Bachem) disuelto en Tritón X-100. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos transparentes.

2. La placa se incubó durante 30 min a 37 °C y se paró añadiendo 50 µL de ácido acético 1 M.
3. 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.
4. Los valores de DPPIV se expresaron en unidades internacionales/mL de cultivo. 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.

8.5. Actividad caseinolítica

Esta técnica fue puesta a punto por Salamone y Wodzinski (1997). Se basa en la propiedad de las proteínas de absorber a una longitud de onda de 280 nm y en la capacidad del TCA para precipitar proteínas, pero no péptidos pequeños o aminoácidos. De esta forma, cuando se incuba una enzima con el sustrato (caseína), si la enzima no tiene actividad, todo el sustrato estará en forma de caseína, y al añadir TCA precipitará por lo que el sobrenadante no dará absorbancia a 280 nm. Por el contrario si la proteína tiene actividad, hidrolizará la caseína en péptidos más pequeños que no precipitarán con el TCA, dando lugar a una lectura de absorbancia a 280 nm más alta. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Se pesaron 10 mg de serrapeptasa y se disolvieron en 1 mL de Tris/HCl pH 8 0,1 M. En función de la característica a estudiar se siguió uno de los pasos siguientes: a) para ensayar la estabilidad a distintas temperaturas, se añadieron 4,25 µL de la solución de enzima a 95,75 µL de Tris/HCl pH 8 0,1 M, y cada muestra se incubó durante 60 min a 10, 20, 30, 37, 40, 50 y 60 °C; b) para ensayar la estabilidad a distintos pH, se añadieron 4,25 µL de la solución de enzima a 96,75 µL del buffer correspondiente (ácido cítrico para pH 2-5, Tris/HCl para pH 6-7, Glicina/NaOH pH 8-12) y cada muestra se incubó durante 60 min a 37 °C.
2. A cada tiempo, se sacaron las muestras y se añadieron 10 µL de cada una en un tubo eppendorf que contenía 750 µL buffer Tris/HCl pH 8 0,1 M, 1% caseína, 20 mg/mL MgCl₂ y 90 µL agua milli-Q.

3. Se incubó en un baño a 30 °C durante 30 min.
4. Se paró la reacción añadiendo 500 µL TCA 10%.
5. Se incubó en un baño a 30 °C durante 15 min.
6. Para eliminar la proteína que no había sido hidrolizada y que por lo tanto había precipitado con el TCA, se centrifugó a 10000 xg durante 10 min. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio.
7. La A_{280} se midió usando para ello el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, Biocompare.

8.6. Actividades elastásica y mucilaginásica

Para analizar las actividades elastásica y mucilaginásica los microorganismos se crecieron en placas de MRS que contenían 0,1% de elastina-congo rojo o 0,5% de mucina gástrica porcina respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h empleando para cada microorganismo las mismas condiciones de oxígeno en las que se aisló. Las placas se procesaron según lo descrito por Pruteanu *et al.* (2011):

1. Para detectar la actividad elastásica, las placas se almacenaron a 4 °C durante 3 días. La actividad elastásica se detectó por la formación de un halo alrededor de las colonias que la producen.
2. Para detectar la actividad mucilaginásica las placas se tiñeron con una solución 0,1% de negro de amida durante 30 min y posteriormente se destiñeron con una solución de 25% isopropanol y 10% ácido acético. Las zonas donde la mucina ha sido degradada aparecen como zonas descoloridas alrededor de las colonias.

8.7. Actividad peptidoglicano hidrolásica

La presencia de la actividad lítica se determinó basándose en el método descrito por Østle *et al.* (1995) bien haciendo réplicas de los microorganismos en placas de MRS que contenían células autoclavadas de lactobacilos o bien añadiendo el sobrenadante de los microorganismos a ensayar en pocillos de placas de bioensayo con el mismo medio. La presencia de enzimas líticas se observa mediante la formación de un halo de

degradación del peptidoglicano (contenido en la pared celular de las bacterias autoclavadas que forman el medio) alrededor de la colonia o del pocillo analizado. El medio de cultivo con células autoclavadas se realizó de la siguiente manera:

1. Se inoculó una colonia aislada en 50 mL de MRS líquido y se incubó a 100 rpm y 37 °C.
2. Cuando los cultivos alcanzaron DO_{600} 1,2 se centrifugaron a 4000 xg durante 10 min a 4 °C y se lavaron con agua destilada tras lo cual se volvieron a centrifugar.
3. El pellet se resuspendió en 15 mL de agua destilada y se autoclavó durante 1 h.
4. El cultivo autoclavado se centrifugó a 4000 xg durante 10 min a 4 °C y el pellet se resuspendió en 250 μ L de agua destilada y se añadió a 50 mL de MRS fundido.
5. Se repartió el medio en placas de Petri y se dejó solidificar. Para hacer bioensayo de autólisis, en cada placa de Petri de diámetro 5,5 cm se añadieron 12,5 mL del medio y una vez solidificado se hizo un pocillo en cada placa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE MICROORGANISMOS DUODENALES

El gluten es el factor ambiental responsable de la activación de la EC. Aunque se postula que los microorganismos pueden ser importantes para el desarrollo de esta enfermedad, se desconoce el papel que pueden jugar los microorganismos duodenales en el metabolismo del gluten.

Por este motivo, nos planteamos la caracterización de la microbiota duodenal capaz de crecer en un medio con gluten (MCG-3), en individuos adultos sanos, enfermos celíacos activos, enfermos celíacos tratados y familiares de celíacos con susceptibilidad genética. Para ello se llevó a cabo de forma paralela un estudio molecular mediante PCR-DGGE, y un cultivo de la microbiota presente en biopsias duodenales.

1.1. Análisis molecular mediante PCR-DGGE de la microbiota duodenal

La microbiota del tracto GI cumple varias funciones importantes para el hospedador, como son la producción de vitaminas, la protección frente a microorganismos patógenos o la ayuda en la digestión de alimentos (Patrick 2009). Se sabe que un balance en la composición de las comunidades microbianas del tracto gastrointestinal es esencial para el mantenimiento de la salud. Son muchas las enfermedades descritas hasta el momento en las que se ha observado una disbiosis intestinal que podría jugar un papel importante en su desarrollo, entre ellas la EC.

La finalidad de este estudio fue determinar qué microorganismos son capaces de crecer en un medio con gluten y comparar esta microbiota entre los distintos grupos de individuos en función del diagnóstico.

Para hacer este análisis se realizaron cultivos en MCG-3 a partir de 52 biopsias duodenales de individuos adultos, distribuidas en función del diagnóstico de la siguiente manera: pacientes con enfermedad celíaca activa (CA) (N=5), pacientes celíacos tratados (CT) (N=14), familiares con HLA-DQ susceptible a la EC (F) (N=26) y familiares de celíacos sin susceptibilidad genética, que fueron considerados como sanos (S) (N=7). Las biopsias fueron inoculadas en medio MCG-3 e incubadas durante 48 h a 37 °C. Tras la incubación se extrajo el ADN a partir del pellet obtenido tras centrifugar 500 µL del cultivo durante 15 min a 10000 rpm y mediante PCR se amplificó la región V3 del ADNr 16S (Anexo II) de aproximadamente 200 pb empleando los cebadores universales HDA1GC/HDA2. Los productos de PCR fueron separados mediante DGGE en geles del

10% de acrilamida/bisacrilamida en un gradiente desnaturante de urea y formamida (35-55%). La electroforesis se llevó a cabo a 70 V y a 60 °C durante 15 h.

En la Figura 10 se observan los perfiles de DGGE obtenidos a partir de los cultivos de biopsias duodenales. Los distintos perfiles mostraron entre 1 y 13 bandas intensas y bien resueltas. No existe una diferencia respecto al número de bandas en función del diagnóstico, sino que el número de bandas parece ser dependiente de cada individuo. Aunque uno de los objetivos que se pretendía era observar si se producía un agrupamiento en función del diagnóstico mediante el método UPGMA basado en el coeficiente de Dice, debido a la simplicidad de los perfiles electroforéticos no se pudo realizar este estudio.

A partir del DGGE se seleccionaron varias bandas para llevar a cabo su identificación molecular (Figura 10). Para identificar estas bandas se secuenció el ADN, y el estudio se completó mediante un análisis filogenético cuyo resultado se muestra en la Tabla 10. El árbol filogenético empleado para el análisis se muestra en el Anexo III. La frecuencia de las diferentes especies detectadas mediante PCR-DGGE se muestra en la Tabla 11.

Tabla 10. Identificación de las distintas bandas extraídas y secuenciadas del DGGE.

Bandas identificadas	Especie identificada	Identidad (%)
B11, B16, B28, B59, B66, B67, B68, B70	<i>Lactobacillus gasseri</i>	100
B35, B36, B50	<i>Lactobacillus fermentum</i>	100
B72, B26, B32	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100
B25, B21, B41, B46, B48, B52, B53, B54, B74, B75, B78, B86, B87	<i>Streptococcus sp.</i>	100
B43	<i>Lactobacillus brevis</i>	100
B69	<i>Lactobacillus helveticus</i>	100
B45, B55	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	99
B12	<i>Shigella sp.</i>	100
B38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98
B76	<i>Staphylococcus warneri/pasteuri</i>	100
B39, B40	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
B47	<i>Streptococcus oligofermentas/parasanguinis</i>	99
B61	<i>Neisseria flavescens</i>	100
B22, B31, B37, B42, B49, B65, B79	<i>Streptococcus salivarius/thermophilus</i>	100
B20	<i>Lactobacillus oris</i>	100
B57	<i>Bacillus anthracis/cereus/thuringiensis</i>	100
B14, B62	<i>Escherichia coli/fergusonii</i>	100
B33, B63, B64, B58	<i>Veillonella atypica/sp.</i>	100
B77	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100
B7, B34, B71, B15	<i>Lactobacillus reuteri/vaginalis</i>	100

Los microorganismos dominantes en el cultivo en MCG-3 fueron las bacterias lácticas, principalmente los estreptococos seguidos por los lactobacilos. A pesar de que de nuevo, debido a la simplicidad de los perfiles electroforéticos y al pequeño tamaño muestral de alguno de los grupos no es correcto llevar a cabo un análisis estadístico, se pueden apreciar algunas diferencias llamativas. Si nos fijamos a nivel de especie (Tabla 11), podemos observar que *Streptococcus salivarius/thermophilus* aparece en el 100% de los voluntarios sanos y solo en un 20% de los celíacos activos. También es notable la ausencia de *Veillonella atypica/sp.* en sanos, mientras que aparece aproximadamente en el 40% de celíacos activos. En cambio, si nos fijamos a nivel de género (Figura 11) no hay una diferencia tan grande en cuanto a *Streptococcus*, y lo más llamativo sigue siendo la ausencia de *Veillonella* así como de *Staphylococcus* en sanos.

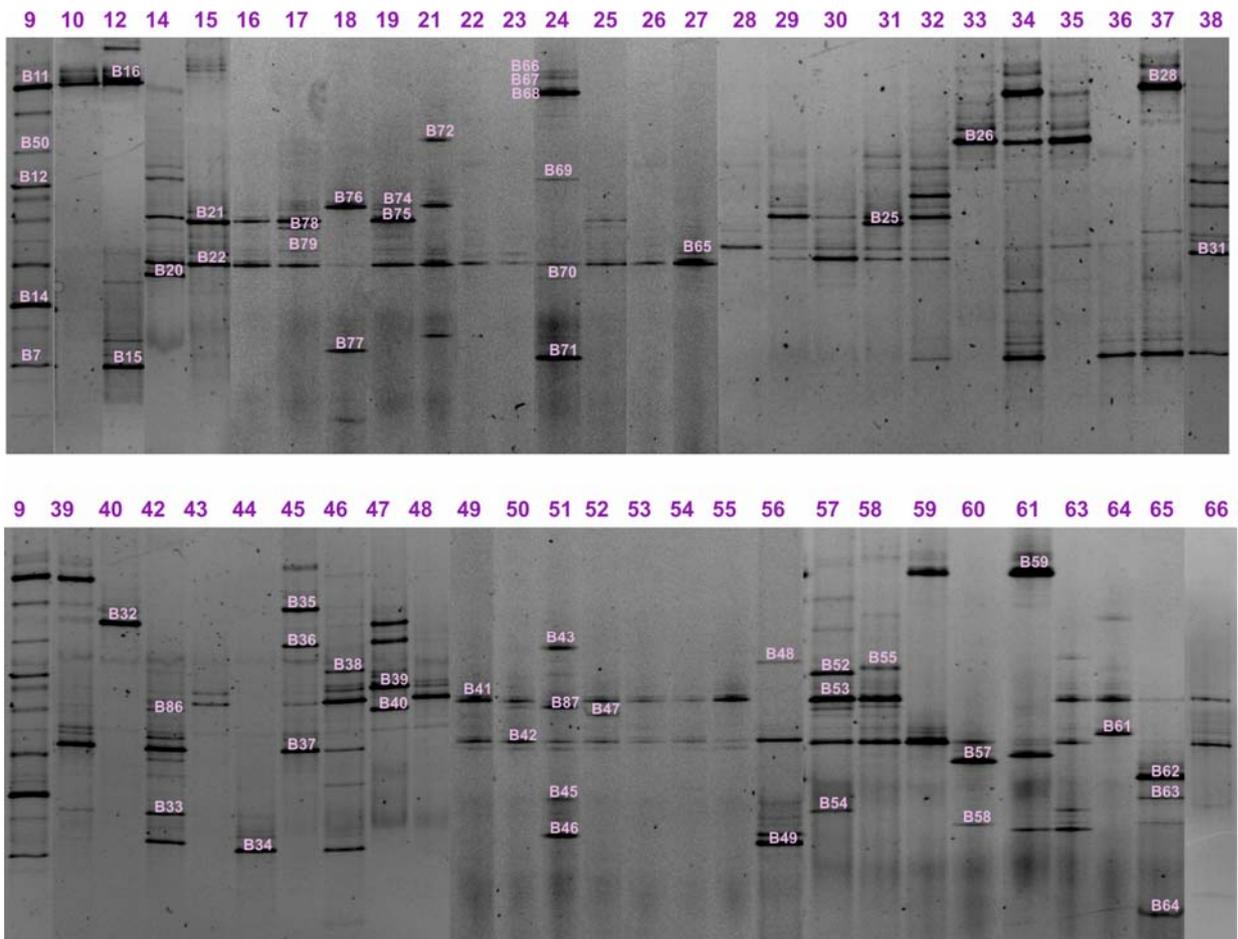


Figura 10. Perfiles de DGGE de las comunidades de bacterias obtenidas a partir del cultivo en MCG-3 de biopsias duodenales de adultos. Los números en la parte superior de cada carril indican el paciente. Los números incluidos en el gel y precedidos por la letra B indican las bandas secuenciadas cuya identificación se muestra en la Tabla 10.

Tabla 11. Frecuencias de las diferentes especies detectadas mediante DGGE en función del diagnóstico.

Microorganismo	F % (N=26)		S % (N=7)		CT % (N=14)		CA % (N=5)		Total no EC (N=33)		Total EC (N=19)	
<i>Bacillus anthracis/cereus /thuringiensis</i>	0,0	(0/26)	0,0	(0/7)	7,1	(1/14)	0,0	(0/5)	0,0	(0/33)	5,3	(1/19)
<i>Enterococcus faecalis</i>	15,4	(4/26)	14,3	(1/7)	7,1	(1/14)	20,0	(1/5)	15,2	(5/33)	10,5	(2/19)
<i>Escherichia coli/fergusonii</i>	3,9	(1/26)	0,0	(0/7)	14,3	(2/14)	0,0	(0/5)	3,0	(1/33)	10,5	(2/19)
<i>Shigella sp.</i>	7,7	(2/26)	14,3	(1/7)	0,0	(0/14)	0,0	(0/5)	9,1	(3/33)	0,0	(0/19)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3,9	(1/26)	14,3	(1/7)	7,1	(1/14)	0,0	(0/5)	6,1	(2/33)	5,3	(1/19)
<i>Lactobacillus brevis</i>	7,7	(2/26)	0,0	(0/7)	0,0	(0/14)	0,0	(0/5)	6,1	(2/33)	0,0	(0/19)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	23,1	(6/26)	14,3	(1/7)	14,3	(2/14)	0,0	(0/5)	21,2	(7/33)	10,5	(2/19)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	30,8	(8/26)	14,3	(1/7)	21,4	(3/14)	40,0	(2/5)	27,3	(9/33)	26,3	(5/19)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	3,9	(1/26)	0,0	(0/7)	0,0	(0/14)	0,0	(0/5)	3,0	(1/33)	0,0	(0/19)
<i>Lactobacillus oris</i>	11,5	(3/26)	0,0	(0/7)	7,1	(1/14)	0,0	(0/5)	9,1	(3/33)	5,3	(1/19)
<i>Lactobacillus reuteri/vaginalis</i>	26,9	(7/26)	14,3	(1/7)	7,1	(1/14)	20,0	(1/5)	24,2	(8/33)	10,5	(2/19)
<i>Neisseria flavescens</i>	0,0	(0/26)	0,0	(0/7)	7,1	(1/14)	0,0	(0/5)	0,0	(0/33)	5,3	(1/19)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0	(0/26)	0,0	(0/7)	7,1	(1/14)	0,0	(0/5)	0,0	(0/33)	5,3	(1/19)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23,1	(6/26)	0,0	(0/7)	7,1	(1/14)	20,0	(1/5)	18,2	(6/33)	15,8	(3/19)
<i>Staphylococcus warneri/pasteuri</i>	3,9	(1/26)	0,0	(0/7)	7,1	(1/14)	20,0	(1/5)	3,0	(1/33)	10,5	(2/19)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,0	(0/26)	0,0	(0/7)	0,0	(0/14)	20,0	(1/5)	0,0	(0/33)	5,3	(1/19)
<i>Streptococcus oligofermentans/parasanguinis</i>	3,9	(1/26)	14,3	(1/7)	0,0	(0/14)	20,0	(1/5)	6,1	(2/33)	5,3	(1/19)
<i>Streptococcus salivarius/thermophilus</i>	69,2	(18/26)	100,0	(7/7)	71,4	(10/14)	20,0	(1/5)	75,8	(25/33)	57,9	(11/19)
<i>Streptococcus sp.</i>	57,7	(15/26)	57,1	(4/7)	71,4	(10/14)	80,0	(4/5)	57,6	(19/33)	73,7	(14/19)
<i>Veillonella atypica/sp.</i>	15,4	(4/26)	0,0	(0/7)	14,3	(2/14)	40,0	(2/5)	12,1	(4/33)	21,1	(4/19)

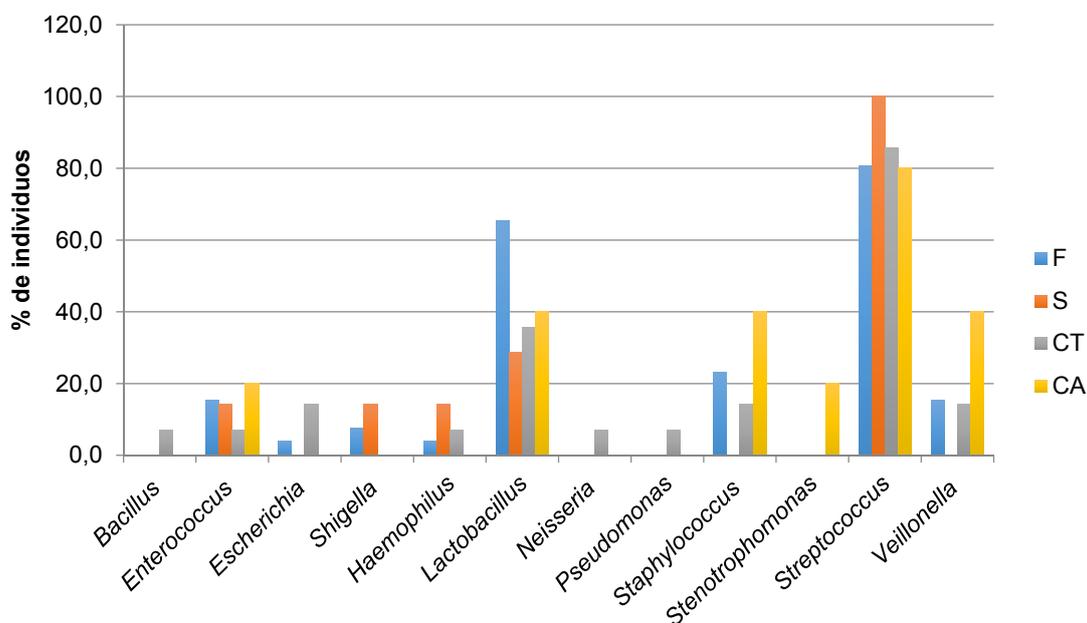


Figura 11. Representación del porcentaje de individuos que presenta un determinado género bacteriano, en función del diagnóstico.

Analizando la Figura 12 en la que se muestra la distribución de los microorganismos a nivel de género según el diagnóstico, se pueden apreciar los mismos resultados que los obtenidos al representar el porcentaje de individuos que presentan un determinado género. Los individuos sanos son los que presentan una frecuencia mayor de *Streptococcus*. Además en los sanos, los géneros *Veillonella* y *Staphylococcus*, que representan entre un 5-10% de los microorganismos totales en los otros grupos, están ausentes.

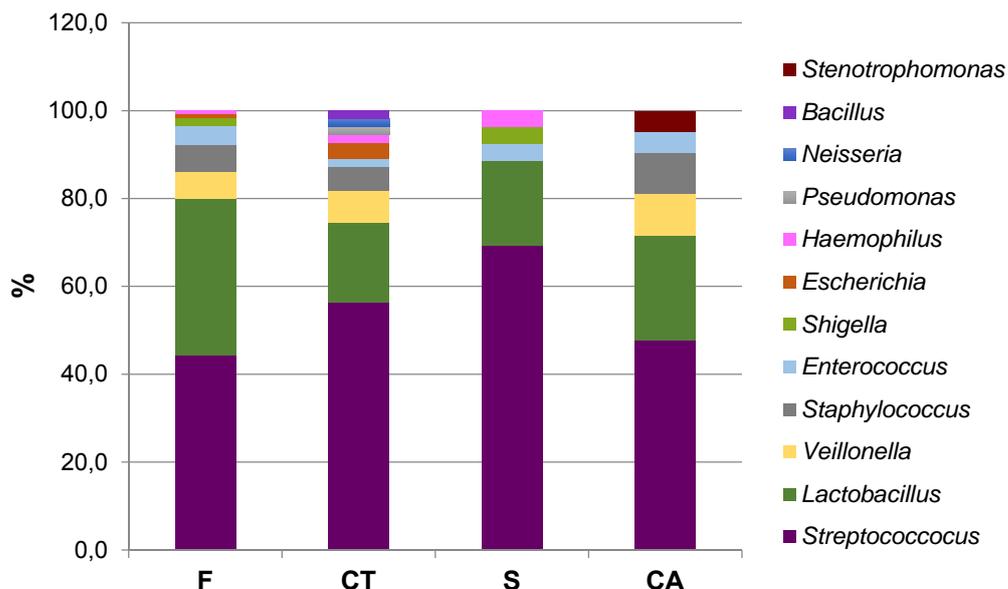


Figura 12. Porcentaje que representa cada género bacteriano respecto al 100% de microorganismos presentes para cada grupo en función del diagnóstico.

1.2. Aislamiento e identificación de la microbiota duodenal implicada en el metabolismo del gluten

Se sabe que la técnica PCR-DGGE (Cocolin *et al.*, 2001; van Beek y Priest, 2002) es capaz de detectar las especies más abundantes de una comunidad. Sin embargo, se obvian aquellas que están menos representadas. Aunque esta técnica nos proporciona una visión general de la microbiota duodenal que crece en un medio con gluten, no nos permite estudiar en detalle aquellos aspectos funcionales de las bacterias que nos interesan. Por esta razón se decidió de forma paralela al DGGE, aislar los microorganismos duodenales implicados en el metabolismo de gluten y caracterizarlos.

Para ello se llevaron a cabo cultivos en MCG-3 a partir de 42 biopsias duodenales de individuos adultos distribuidas en función del diagnóstico de la siguiente manera: pacientes con enfermedad celiaca activa (CA) (N=5), pacientes celiacos tratados (CT)

(N=14), familiares con un HLA-DQ susceptible a la EC (F) (N=16) y familiares de celíacos sin susceptibilidad genética, que fueron considerados como sanos (S) (N=7).

Las biopsias fueron inoculadas en medio MCG-3 e incubadas durante 48 h para enriquecer el cultivo en microorganismos capaces de crecer en un medio con gluten como fuente principal de nitrógeno. Posteriormente se plaquearon diluciones seriadas en MCG-3 sólido y se incubaron a 37 °C por duplicado; una réplica se incubó en condiciones anóxicas y la otra en condiciones microóxicas. Después de la incubación se llevó a cabo un análisis *de visu* de las distintas morfologías y se obtuvo un cultivo puro de cada una de ellas.

Para la identificación, con cada una de las bacterias seleccionadas 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 para el ARNr 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores 27F y E939R. Este fragmento se clonó en el vector *StrataClone* amp/kam y se transformó en *E. coli* con el kit comercial *StrataClone Cloning* (Stratagene). Posteriormente se comprobó que las bacterias transformadas poseían el fragmento a secuenciar. El ADN plasmídico de aquellas bacterias que tenían el fragmento clonado se purificó y se envió al Servicio de Secuenciación de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. La identificación molecular de las cepas se llevó a cabo mediante diversos programas bioinformáticos; para después ser comparados en la base de datos GenBank del NCBI. La identificación se completó mediante un estudio filogenético (Anexo IV).

El criterio seguido para la selección de los microorganismos de interés fue llevar a cabo la identificación solo de aquellas colonias que cumplieron al menos uno de los siguientes requisitos: i) formaban un halo de degradación de gluten alrededor de la colonia; ii) eran incapaces de crecer en MSG-3 y por lo tanto eran capaces de metabolizar el gluten.

Siguiendo estos criterios se aislaron e identificaron 114 microorganismos pertenecientes a 13 géneros y 32 especies bacterianas distintas (Tabla 12), lo que corrobora que el medio MCG-3 es un medio apropiado para crecer una gran diversidad de microorganismos implicados en el metabolismo del gluten.

En función de las condiciones de oxígeno: se aislaron 60 cepas en condiciones microóxicas englobadas en 9 géneros y 24 especies distintas, y 54 cepas en condiciones anóxicas que forman parte de 9 géneros y 20 especies distintas (Figura 13). En cualquier

caso, hay que tener en cuenta que algunas de estas especies se aislaron en presencia y ausencia de oxígeno. Estas especies fueron: *Actinomyces sp.*, *A. naeslundii*, *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus vaginalis*, *L. reuteri*, *L. casei/paracasei*, *L. oris*, *L. gasseri*, *L. crispatus* y *L. brevis*.

Todas las bacterias se clasificaron dentro de los 4 filos principales que se han descrito que habitan el tracto gastrointestinal humano (Tabla 13). La mayor parte de las cepas pertenecían al filo *Firmicutes* (88%), y un alto porcentaje de estos al género *Lactobacillus*. El 8% de las cepas se clasificaron dentro del filo *Actinobacteria* y en menor proporción dentro de los filos *Proteobacteria* (3%) y *Bacteroidetes* (1%) (Figura 13).

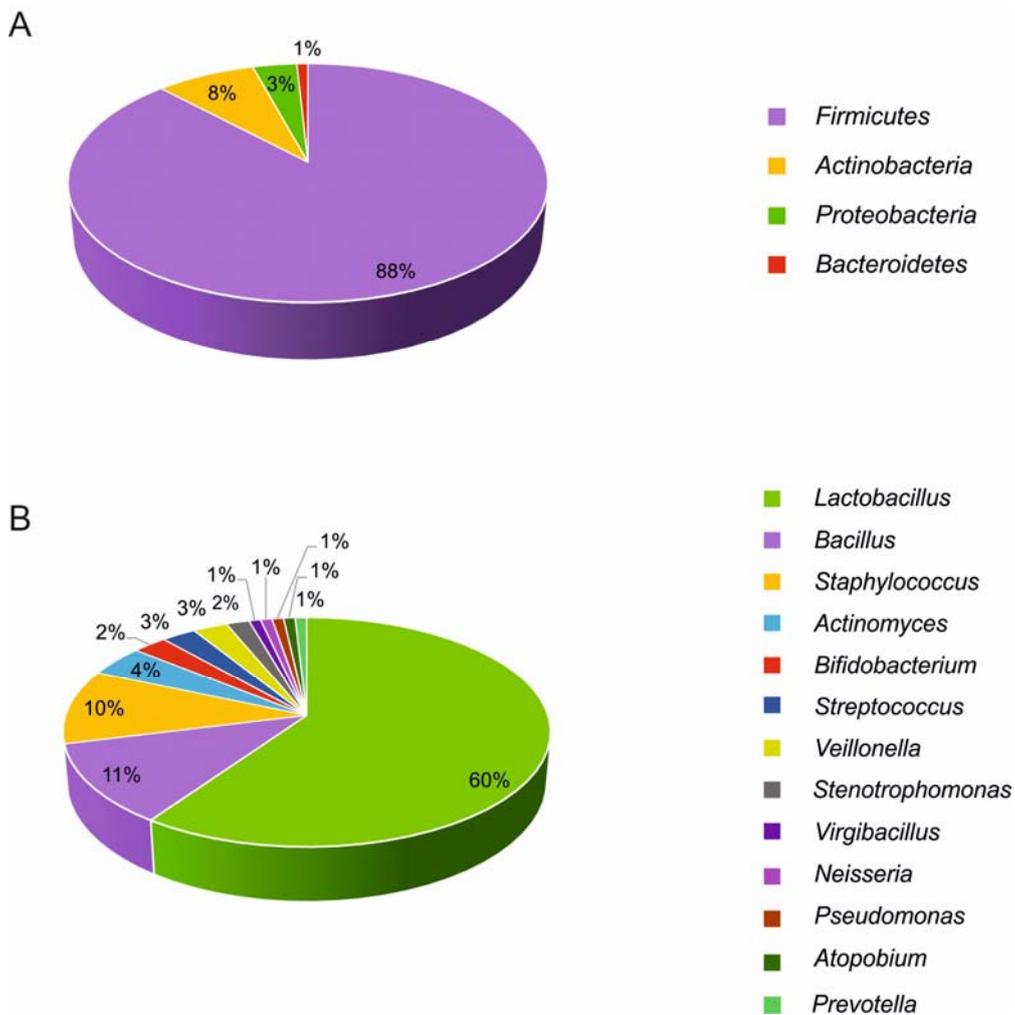


Figura 13. Distribución de los microorganismos aislados de las biopsias duodenales en función del filo (A) y del género (B).

Tabla 12. Microorganismos aislados a partir del cultivo de biopsias duodenales de individuos sanos (S), celíacos tratados (CT), celíacos activos (CA) y familiares de celíacos con susceptibilidad genética (F). En la tabla se muestra la presencia o ausencia de crecimiento del microorganismo cuando se retira el gluten del medio, la actividad glutenásica, la actividad gelatinásica, el crecimiento en medio MCG-1 y la degradación del péptido 33-mer.

Microorganismo	S (N=7)	CT (N=15)	CA (N=5)	F (N=27)	Crecimiento MCG-3/MSG	Actividad glutenásica	Crecimiento MCG-1	Actividad gelatinásica	Degradación 33-mer
<i>Actinomyces sp.</i>		CT64.5	F42.11	F42.5	+/-	-	-	-	CT64.5
<i>Actinomyces naeslundii</i>		F43.3	F43.4		+/-	-	+	-	F43.3 F43.4
<i>Atopobium parvulum</i>		F42.12			+/-	-	-	-	
<i>Bacillus licheniformis</i>	S52.1	F42.6	F42.7	F8.2	+/+	+	+	+	S52.1 F8.2
		CT45.1			+/-	-	+	+	CT45.1
<i>Bacillus subtilis</i>	S52.2	CA48.2	CA48.4	CA48.5	+/+	+	+	+	S52.2 CA48.2 CA48.4 CA48.5
<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>		F8.3	F51.1		+/+	+	+	+	F8.3 F51.1
		F51.10			+/-	-	+	+	F51.10
<i>Bacillus pumilus</i>		CT56.5			+/+	+	+	+	CT56.5
<i>Bifidobacterium longum</i>		CT49.2	S52.5		+/-	-	+	-	
<i>Bifidobacterium dentium</i>		F50.1			+/-	-	-	-	
<i>Lactobacillus brevis</i>		F51.4	F51.5	F51.6 F51.8	+/-	-	+	-	
<i>Lactobacillus crispatus</i>		CT56.4	CT56.8		+/-	-	+	-	
<i>Lactobacillus fermentum</i>		CT45.2	F39.3		+/-	-	+	-	F39.3
<i>Lactobacillus frumenti</i>		F54.3			+/-	-	-	-	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	S32.3	S32.5	S32.6	S59.1	+/-	-	+	-	F39.4
	S59.2	S59.3	CT61.2	CT61.4					
	CA37.1	CA37.4	F8.7	F8.12					
	F12.4	F12.11	F12.12	F12.17					
	F12.18	F12.25	F12.26	F12.28					
	F38.1	F38.4	F39.4	F39.9					
<i>Lactobacillus oris</i>		F12.19	F12.21		+/-	-	+	-	F12.19

<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	F51.3 F51.7 S19.9 S19.11 CT25.1 CT25.3	+/- +/+	- +	+ +	- -
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CT46.4 F12.8 F12.22 F8.5 F8.11 F12.7	+/- +/-	- -	+ -	- -
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	S32.2	+/-	-	+	- S32.2
<i>Lactobacillus salivarius</i>	S32.1 F38.2	+/-	-	+	- F38.2 S32.1
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	CT56.2 CT56.3 CT56.6 CT61.1 CT61.3 CA37.2 CA37.3 F12.9 F12.10 F12.24 F36.1 F36.2 F36.4 F36.5 F38.3 F44.1 F44.2 F44.3	+/-	-	-	- F36.2 F44.1 F44.2
<i>Neisseria flavescens/perflava</i>	CT64.2	+/-	-	+	-
<i>Prevotella histicola</i>	F42.10	+/-	-	-	+ F42.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CT46.1	+/+	+	+	+ CT46.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	F39.1 F39.5	+/+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	F12.27 F35.1 F35.3 F39.2 F55.4 CT40.1 CT40.2 CT64.1 CT64.4	+/- +/+	- +	+ +	- +
<i>Staphylococcus warneri/pasteuri</i>	CA18.6	+/-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CA18.4 CA18.5	+/+	+	+	+ CA18.4 CA18.5
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	F55.2	+/-	-	+	-
<i>Streptococcus salivarius/thermophilus</i>	F55.3	+/+	+	+	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	CT46.3	+/-	-	+	-
<i>Veillonella atypica/sp.</i>	CT56.9 CT60.3 F39.8	+/-	-	+	-
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	S52.4	+/+	+	-	+

Tabla 13. Clasificación taxonómica de los microorganismos aislados de los cultivos de biopsias duodenales.

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie					
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	Actinomyces sp. A. naeslundii					
		Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Atopobium	A. parvulum					
		Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	B. longum B. dentium					
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	B. licheniformis B. pumilus B. subtilis B. subtilis/amyloliquefaciens					
				Virgibacillus	V. pantothenicus					
			Staphylococcaceae	Staphylococcus	S. aureus S. epidermidis S. warneri/pasteuri					
					Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	L. brevis L. casei/paracasei L. crispatus L. fermentum L. frumenti L. gasseri L. oris L. reuteri L. rhamnosus L. salivarius L. vaginalis		
		Streptococcaceae	Streptococcus	S. anginosus S. parasanguinis S. salivarius/thermophilus						
				Negativicutes				Selenomonadales	Veillonellaceae	Veillonella
		Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales				Neiseriaceae	Neisseria	N. flavescens/perflava
			Gammaproteobacteria	Pseudomonadales				Pseudomonadaceae	Pseudomonas	P. aeruginosa
				Xanthomonadales				Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	S. maltophilia
		Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	P. histicola			

Las bacterias que participan en el metabolismo del gluten fueron aisladas a partir de los 4 grupos de individuos incluidos en este estudio. Empleando MCG-3 para su crecimiento, no se observa una microbiota duodenal estable entre los distintos individuos, sino que las especies aisladas parecen ser dependientes de cada persona. Para analizar si existen especies compartidas o no por los distintos grupos, se representaron las especies aisladas en función del diagnóstico mediante un diagrama de Venn (Figura 14). Esta representación se hizo teniendo en cuenta los tres grupos considerados más relevantes: sanos (N=7), celíacos activos (N=5) y celíacos tratados (N=14). Al analizar los resultados no se observó una distribución clara de ningún grupo bacteriano para alguno de los conjuntos de individuos incluidos en el estudio. Esta

representación permite apreciar que a mayor número de individuos que forman un grupo, mayor es la diversidad bacteriana que aparece en él. Si comparamos esto último con la Tabla 12, los datos sugieren que las especies aisladas son características del individuo y no del diagnóstico. Lo que si se observa en todos los casos, es que *Lactobacillus* es el grupo bacteriano principal, siendo la especie más frecuente *L. gasseri*. Precisamente es *L. gasseri* el único microorganismo que aparece representado en S, CA y CT.

A pesar de no observarse diferencias en función del diagnóstico de los sujetos de estudio, algunos grupos bacterianos sólo se aislaron en grupos específicos. Curiosamente, algunos patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* o *Streptococcus anginosus* solo fueron aislados de enfermos celiacos.

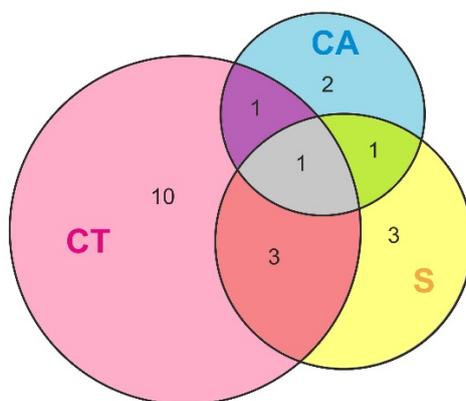


Figura 14. Diagrama de Venn que muestra el número de especies compartidas por los distintos grupos en función del diagnóstico.

De los 114 microorganismos, 84 se seleccionaron por no ser capaces de crecer cuando se retiraba el gluten del medio de cultivo, y 30 por presentar actividad glutenásica. No hubo ningún microorganismo que cumpliera ambos criterios, aunque si encontramos ciertas especies como son *B. licheniformis*, *B. subtilis/amyloliquefaciens*, *L. casei/paracasei* y *Staphylococcus epidermidis*, en las cuales las distintas cepas fueron seleccionadas unas por degradar gluten, y otras por no crecer cuando este se eliminaba del medio (Tabla 12).

Entre los microorganismos capaces de hidrolizar el gluten encontramos principalmente especies de los géneros *Bacillus*, aunque también se observa esta actividad en *L. casei/paracasei*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus salivarius/thermophilus*, *Staphylococcus*

epidermidis y *Staphylococcus aureus* (Tabla 12). Estos microorganismos se encontraron en todos los grupos de individuos, por lo que no parece estar relacionado con el diagnóstico. La misma conclusión se obtiene cuando analizamos los microorganismos seleccionados por su capacidad para metabolizar el gluten.

1.3. Estudio de las actividades glutenásica y gelatinásica

El medio que se ha empleado para el aislamiento de microorganismos contiene gluten digerido y sin digerir como fuente principal pero no exclusiva de nitrógeno. Hemos visto que algunos microorganismos aislados degradan el gluten extracelularmente, y en otros casos sabemos que utilizan el gluten para crecer. Sin embargo, no sabemos si todos estos microorganismos serían capaces de crecer empleando el gluten sin digerir como única fuente de nitrógeno o si por el contrario necesitan otras fuentes de nitrógeno o gluten digerido. Para comprobarlo, cada una de las bacterias fue replicada en MCG-1, un medio diseñado en nuestro laboratorio cuya única fuente de nitrógeno es gluten sin digerir. Además para caracterizar si presentaban actividad gelatinásica, se hicieron réplicas en placas de MCGel; el mismo medio que el empleado para el aislamiento pero que contiene gelatina en lugar de gluten. Cada microorganismo fue incubado durante 48 h a 37 °C en las mismas condiciones de oxígeno en las que se aisló. La actividad gelatinásica se reveló añadiendo TCA 30% a las placas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

La mayoría de los microorganismos testados crecieron en MCG-1, lo cual confirma su implicación en el metabolismo del gluten. Las excepciones fueron principalmente microorganismos con requerimientos de crecimiento muy estrictos como son *Actinomyces*, *Atopobium* o *Bifidobacterium*. Salvo *V. pantothenicus*, el resto de microorganismos que no crecieron en MCG-1 habían sido seleccionados previamente por emplear el gluten para crecer. Estos resultados sugieren que este grupo de microorganismos en lugar del gluten como tal, lo que podría estar empleando para el crecimiento son los péptidos generados por la digestión del gluten con pepsina.

El crecimiento en placas con gelatina reveló que todas las especies de *Bacillus*, independientemente de su actividad glutenásica, tienen actividad gelatinásica. Esta actividad también la presentaron otros microorganismos degradadores de gluten como son *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *V. pantothenicus* y un microorganismo que no degradaba gluten extracelularmente, *Prevotella histicola*. Es común que las proteasas

tengan actividad sobre diferentes sustratos, por lo que inicialmente se pensó en la posibilidad de que la enzima con actividad gelatinásica y glutenásica fuesen en realidad la misma. Sin embargo, hay determinadas especies que muestran solo actividad glutenásica, o solo actividad gelatinásica bajo las mismas condiciones de cultivo, lo que sugiere que estos microorganismos poseen enzimas específicas para cada uno de los sustratos.

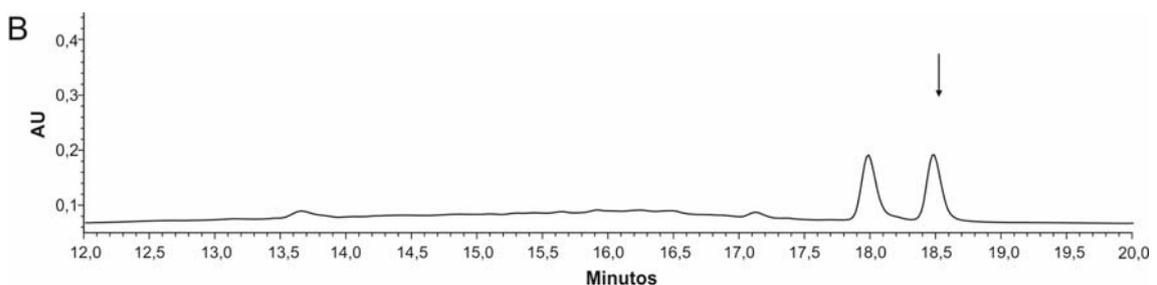
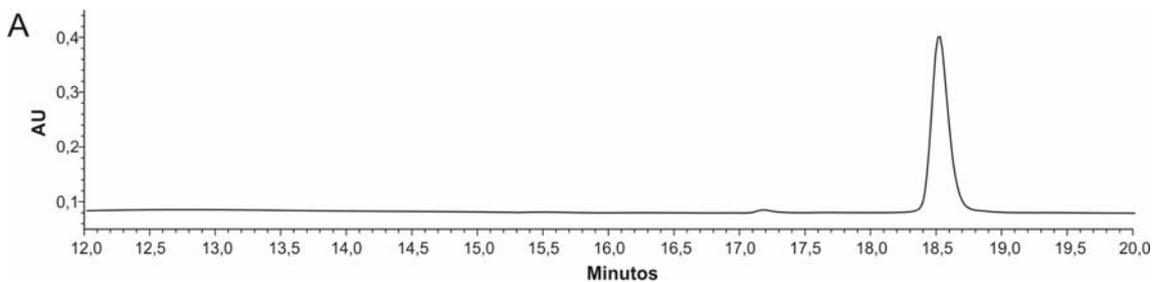
1.4. Estudio de la digestión del 33-mer

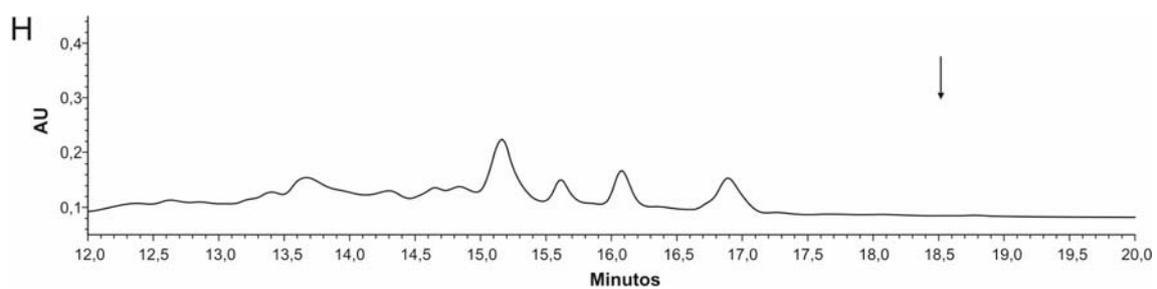
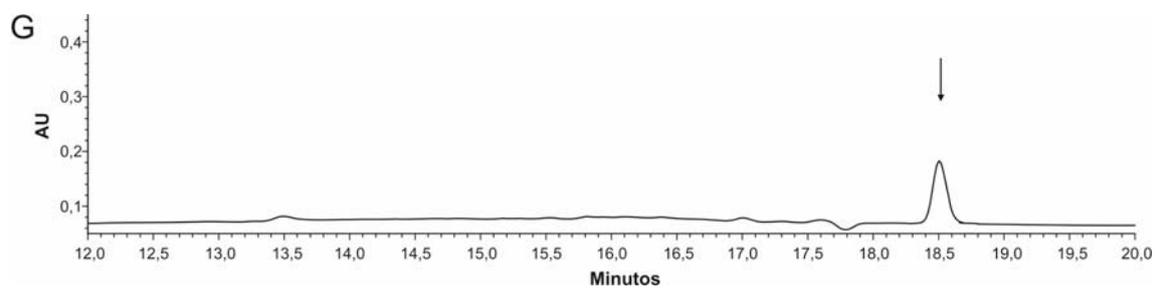
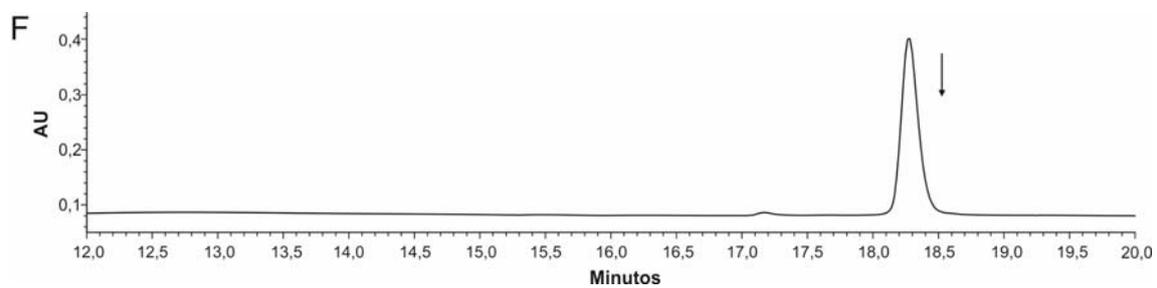
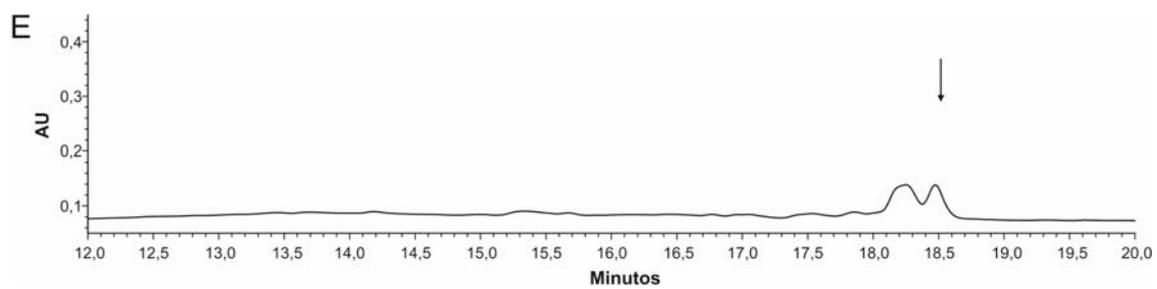
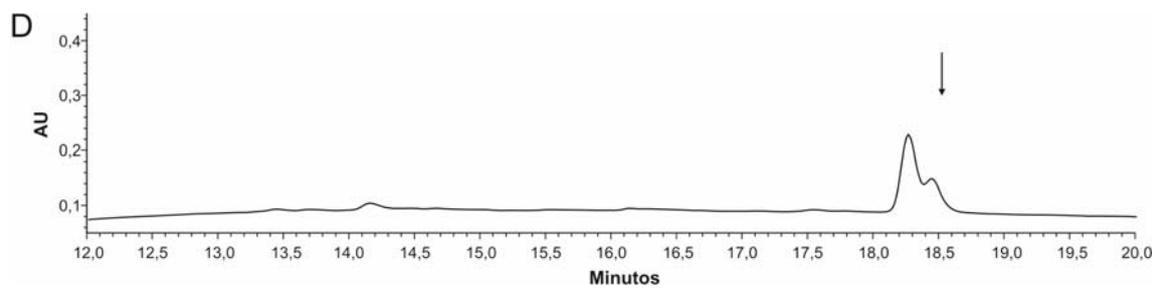
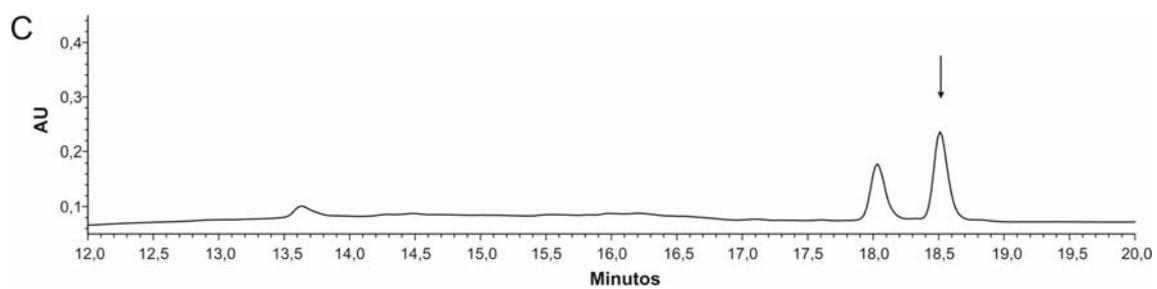
El péptido 33-mer de la α -gliadina es uno de los péptidos inmunotóxicos más estudiados en el campo de la celiacía. El objetivo de este apartado fue comprobar si las distintas cepas aisladas a partir de cultivo de biopsias duodenales presentaban actividad peptidolítica sobre el 33-mer. A partir de cada cultivo puro se inoculó una colonia aislada en 10 mL de MCG-3 líquido y se incubó durante 24 h a 37 °C y 100 rpm. Posteriormente 50 μ L de estos cultivos se usaron para inocular 10 mL de MCG-3 que se incubaron en las mismas condiciones durante 24 h.

Cada uno de los cultivos bacterianos se incubó con el 33-mer durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se analizó la estabilidad del péptido 33-mer mediante HPLC. En la Figura 15 están representados mediante cromatogramas los perfiles de degradación del 33-mer. En la Figura 15 A aparece representado el 33-mer intacto. El perfil producido por *Actinomyces sp.* CT64.5 y *A. naeslundii* F43.3 y F43.4 (Figura 15 B) es similar al que genera *L. salivarius* S32.1 (Figura 15 C), con una pequeña diferencia en el tamaño de los picos correspondientes al 33-mer, y al producto de degradación que aparece en el minuto 18. Lo mismo ocurre con *B. subtilis* CA48.2, CA48.4 y CA48.5 (Figura 15 D) y *B. licheniformis* S52.1, F8.2 y CT45.1 (Figura 15 E) solo que en este caso el producto de degradación aparece un poco más tarde del minuto 18. Además se puede observar que el pico correspondiente al producto de degradación es el mismo que el generado por *B. subtilis* S52.2 (Figura 15 F) el cual hidroliza completamente el 33-mer. Es posible que la diferencia entre las Figuras 15 B y 15 C y entre las Figuras 15 D, 15 E y 15 F se deba a que al añadirse el cultivo en crudo, no se ajustó la cantidad de enzima. En el caso de *L. oris* F12.19 (Figura 15 G), se observa una disminución del 33-mer pero no se ven productos de degradación, lo que podría indicar que es hidrolizado a productos tan pequeños que no son detectados en el HPLC. Si la concentración de enzima añadida o el tiempo de incubación se incrementase, probablemente en todos los casos el pico del 33-mer acabaría desapareciendo por completo. Tanto el ya mencionado

B. subtilis S52.2 como *B. subtilis/amyloliquefaciens* F8.3, F51.1 y F51.10 hidrolizan por completo el 33-mer, aunque por la posición en la que aparece el péptido resultante, se puede suponer que solo se están eliminando algunos aminoácidos y se está generando un péptido de 31-32 residuos (Figura 15 F). *P. aeruginosa* CT46.1 hidroliza por completo el 33-mer y genera varios subproductos de degradación que se muestran como picos entre los minutos 13,5 y 17 (Figura 15 H) mientras que en el caso de *Prevotella histicola* F42.10 (Figura 15 I), *B. pumilus* CT56.5 (Figura 15 J) y *Stenotrophomonas maltophilia* CA18.4 y CA18.5 (Figura 15 K) también lo hidrolizan del todo pero solo se observan como productos de la degradación pequeños picos residuales. En los cromatogramas de *L. fermentum* F39.3, *L. gasseri* F39.4, *L. rhamnosus* S32.2, *L. salivarius* F38.2 y *L. vaginalis* F36.2, F44.1 y F44.2 la hidrólisis es completa; solo se observa la línea base (Figura 15 L), por lo que parece que estos lactobacilos hidrolizan el 33-mer a péptidos muy pequeños, o incluso a aminoácidos.

Todos los microorganismos representados en la Figura 15 han hidrolizado en mayor o menor medida el 33-mer generándose distintos patrones de degradación. En algunos casos como *B. subtilis* o *L. salivarius*, las distintas cepas muestran distintos niveles de degradación del péptido. Aunque aparentemente algunos microorganismos o cepas no sean capaces de hidrolizar el 33-mer por completo, esto puede deberse a que no se ajustó la cantidad de enzima inicial que se añadió. Si el 33-mer se hubiese incubado con mayor cantidad de enzima, durante más tiempo o se hubiese ajustado el pH, las sales, etc. es posible que en todos los casos se hubiese observado la desaparición por completo del pico correspondiente al 33-mer.





Resultados y Discusión

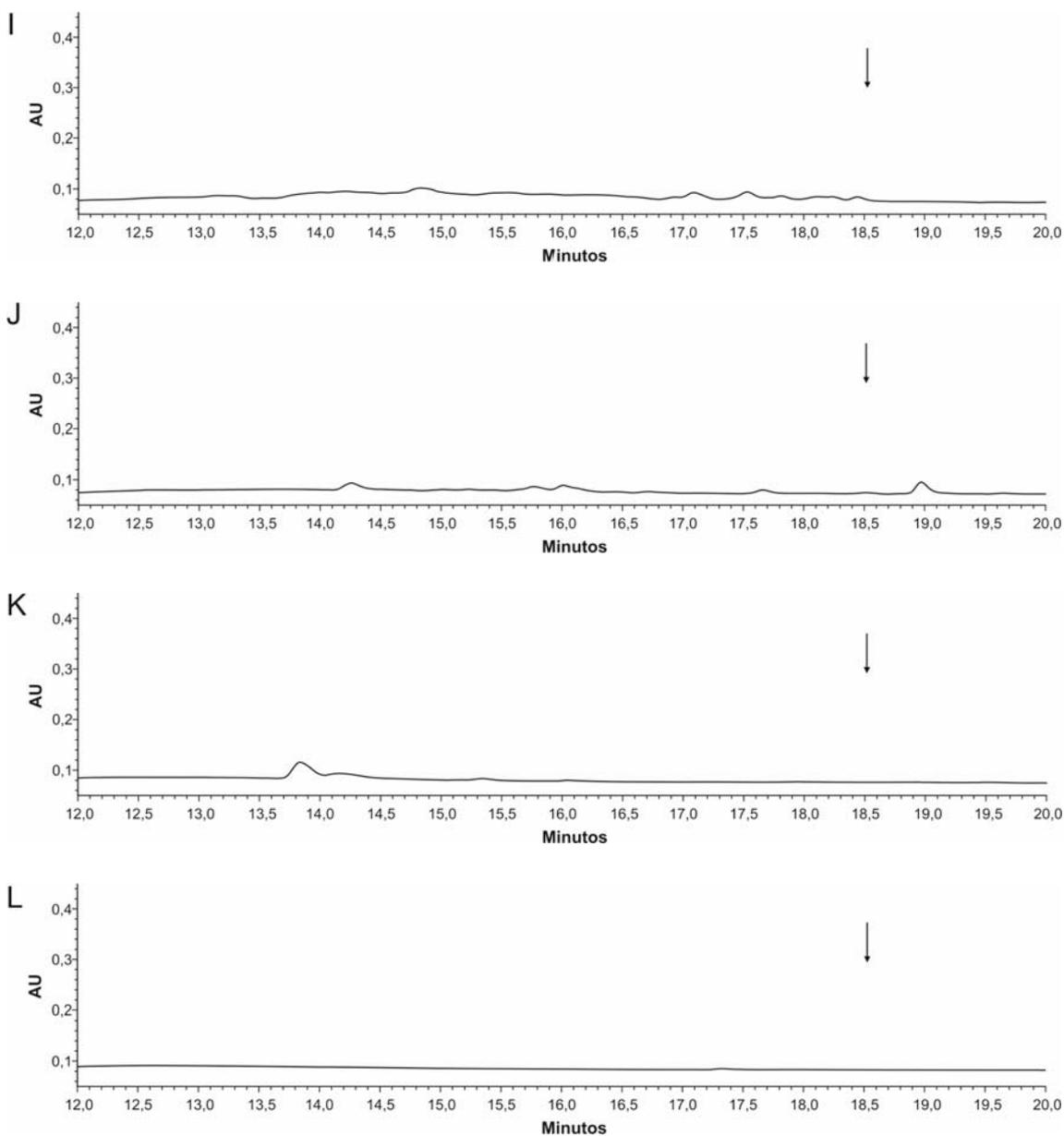


Figura 15. Perfiles de degradación obtenidos como resultado de incubar el 33-mer durante 24 h con cultivos de: *Actinomyces* sp. CT64.5 y *A. naeslundii* F43.3 y F43.4 (B); *L. salivarius* F32.1 (C); *B. subtilis* CA42.2, CA48.4 y CA48.5 (D); *B. licheniformis* S52.1, F8.2 y CT45.1 (E); *B. subtilis* S52.2, *B. subtilis/amyloliquefaciens* F8.3, F51.1 y F51.10 (F); *L. oris* F12.19 (G); *P. aeruginosa* CT46.1 (H); *P. histicola* F42.10 (I); *B. pumilus* CT56.5 (J); *Stenotrophomonas maltophilia* CA18.4 y CA18.5 (K); *L. gasseri* F39.4, *L. rhamnosus* S32.2, *L. fermentum* F39.3, *L. vaginalis* F36.2, F44.1 y F44.2 y *L. salivarius* F38.2 (L). El pico correspondiente al 33-mer intacto se muestra en el primer cromatograma (A).

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS LACTOBACILOS AISLADOS DE BIOPSIAS DUODENALES

Los lactobacilos son un grupo de microorganismos muy interesantes, debido al gran potencial que presentan para su empleo como probióticos. No solo son resistentes al pH ácido, y son QPS (*Qualified Presumption of Safety*), sino que además en algunos casos se ha comprobado que son capaces de modular la respuesta inmune.

Durante el estudio de degradación del 33-mer llevado a cabo con estos microorganismos, se observó que aquellos lactobacilos que lo digerían, solo lo hacían en algunas ocasiones. Esto nos llevó a plantearnos qué podía estar ocurriendo en estos microorganismos para que no siempre hidrolizasen el 33-mer.

Los lactobacilos utilizan los aminoácidos tanto como fuente de nitrógeno como para su metabolismo energético y por ello han desarrollado un sistema proteolítico y peptidolítico muy complejo. Presentan proteasas asociadas a la membrana así como varios sistemas de transporte que les permite tomar los péptidos del medio de cultivo y transportarlos al interior celular. Una vez allí, las enzimas proteolíticas intracelulares son capaces de hidrolizar estos péptidos con el fin de obtener los aminoácidos necesarios para su metabolismo. Esto nos hizo plantearnos la posibilidad de que la presencia o ausencia de degradación del 33-mer que observábamos se debiese a que en algunos casos las enzimas intracelulares o asociadas a membrana se hubiesen liberado al medio extracelular, y en otros casos no. Revisando la literatura encontramos que se han descrito bacterias que presentan un fenómeno de autólisis, el cual podría ser la explicación a las diferencias observadas.

La autólisis ha sido descrita en varios grupos bacterianos, y se puede definir como un mecanismo por el cual los microorganismos liberan al medio extracelular enzimas conocidas como autolisinas, capaces de destruirles a sí mismos (Ostlie 1995). Las autolisinas son peptidoglicano hidrolasas, por lo que su mecanismo de actuación consiste en hidrolizar los enlaces covalentes del peptidoglicano; el componente principal de la pared celular (Cibik 2004).

Por lo tanto, el objetivo que nos propusimos en este apartado fue caracterizar con más detalle los lactobacilos aislados de las biopsias duodenales para comprender mejor su implicación en el metabolismo del gluten, con el fin de poder ser empleados en un futuro como probióticos.

2.1. Estudio de la presencia de factores de patogenicidad

Tanto la actividad elastásica como la actividad mucilaginásica son dos actividades consideradas habitualmente factores de virulencia. En concreto la actividad mucilaginásica es una de las actividades cuyo análisis es recomendado por la FAO para determinar la capacidad probiótica de una cepa aunque, existe un pequeño debate al respecto ya que en algunos casos, esta actividad no se considera un factor de patogenicidad sino una actividad necesaria para el crecimiento del microorganismo en la mucosa intestinal.

Para comprobar si nuestras cepas tenían actividad elastásica y mucilaginásica, se crecieron los lactobacilos en placas que contenían elastina-rojo congo y mucina respectivamente. Ambas actividades se manifiestan como un halo claro de degradación transparente alrededor de las colonias que las producen.

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos. Ninguno de los lactobacilos analizados presenta actividad elastásica. La actividad mucilaginásica parece ser dependiente de especie ya que solo la presenta *L. gasseri*, y además todas las cepas con la excepción de CA37.1 (Figura 16). Por lo tanto, excepto *L. gasseri* ningún otro lactobacilo presenta los posibles factores de patogenicidad ensayados.

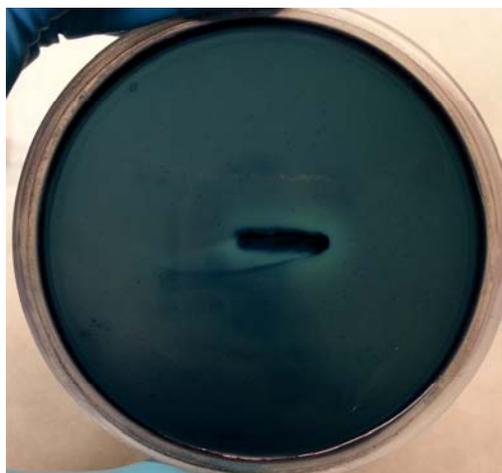


Figura 16. Ejemplo de actividad mucilaginásica producida por *L. gasseri* F8.7.

Tabla 14. Caracterización de la actividad elastásica y mucilaginásica en lactobacilos seleccionados.

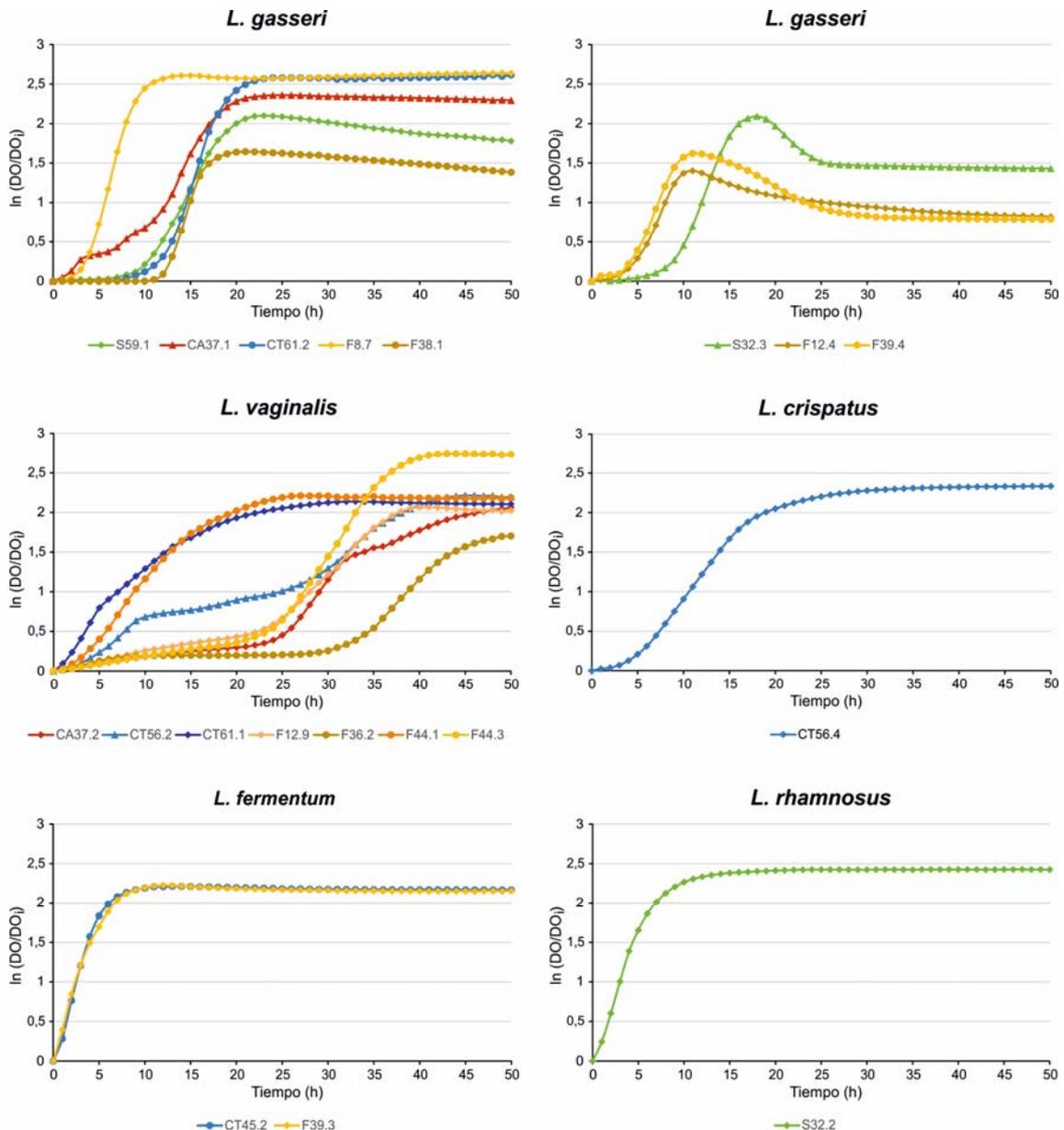
Especie	Cepa	Actividad elastásica	Actividad mucilaginásica
<i>L. reuteri</i>	F8.5	-	-
	F12.7	-	-
	CT46.4	-	-
<i>L. gasseri</i>	S32.3	-	+
	S59.1	-	+
	F8.7	-	+
	F12.4	-	+
	F39.4	-	+
	F38.1	-	+
	CT61.2	-	+
	CA37.1	-	-
<i>L. vaginalis</i>	F12.9	-	-
	F36.1	-	-
	F38.3	-	-
	F44.1	-	-
	F44.3	-	-
	CT56.2	-	-
	CA37.2	-	-
<i>L. oris</i>	F12.19	-	-
<i>L. paracasei</i>	S19.9	-	-
	CT25.1	-	-
<i>L. salivarius</i>	S32.1	-	-
	F38.2	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	S32.2	-	-
<i>L. fermentum</i>	F39.3	-	-
	CT45.2	-	-
<i>L. crispatus</i>	CT56.4	-	-

2.2. Caracterización de los patrones de crecimiento

Con el fin de tener caracterizado el crecimiento de los lactobacilos para poder establecer los tiempos de inóculo y recogida de células en los estudios posteriores de lisis, se hicieron curvas de crecimiento en medio MRS. Para ello se seleccionaron 27 cepas de lactobacilos de las 68 aisladas de biopsia duodenal y tras inocular colonias aisladas de cada microorganismo en 10 mL de MRS líquido, se incubaron a 100 rpm y 37 °C hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,2. Una vez alcanzada la

DO deseada, se inocularon 20 μL de una dilución 1/5 a 180 μL de MRS y se midió la DO_{600} a lo largo de 72 h. En la Figura 17 se representan las curvas de crecimiento obtenidas hasta las 50 h, ya que a partir de ese tiempo todos los microorganismos habían alcanzado la fase estacionaria.

Todas las cepas testadas excepto *L. gasseri* S32.2, F12.4 y F39.4 muestran una curva de crecimiento típica con una fase lag (en determinadas cepas la fase lag es inexistente), una fase exponencial y una fase estacionaria. Sin embargo, *L. gasseri* S32.2, F12.4 y F39.4 una vez finalizada la fase de crecimiento exponencial entran en una fase de muerte celular para luego mantenerse en fase estacionaria a una densidad muy baja. Esta bajada podría estar relacionada con mecanismos de autólisis del propio microorganismo para regular su población y no agotar los nutrientes del medio.



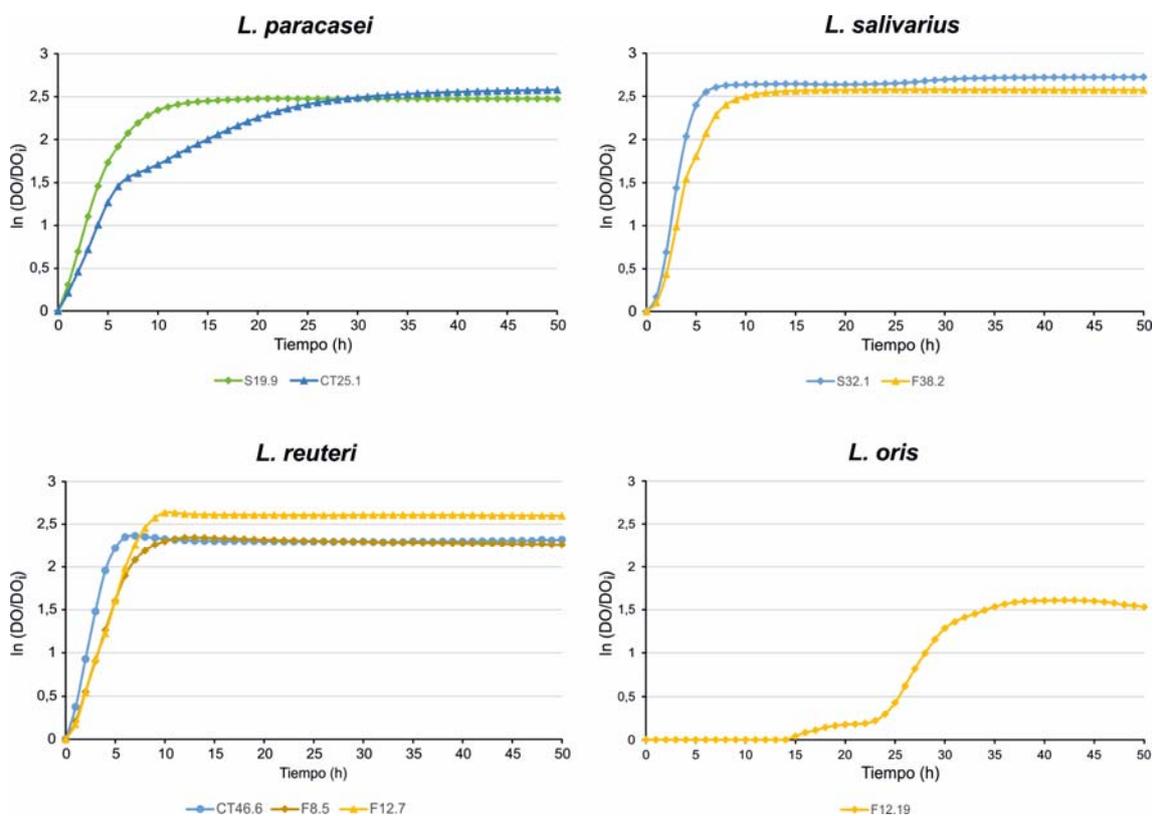


Figura 17. Curvas de crecimiento de cepas de *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. salivarius*, *L. reuteri* y *L. oris*.

2.3. Estudio de la producción de autolisinas

Las autolisinas actúan hidrolizando el peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Esta acción hidrolítica podría ser la responsable de la liberación al medio extracelular de enzimas implicadas en la degradación de péptidos inmunotóxicos del gluten. Para determinar qué lactobacilos presentan actividad autolítica, se seleccionaron varias cepas de 9 especies distintas y cada una de ellas se creció sobre una placa de MRS que contenía células autoclavadas de esa misma cepa. Las cepas analizadas fueron *L. reuteri* F8.5 y CT46.4; *L. gasseri* F8.7, S32.3, CA37.1, F39.4, CT61.2; *L. paracasei* S19.9, CT25.1; *L. oris* F12.19; *L. vaginalis* CT56.2, CA37.2, F44.1; *L. salivarius* S32.2, F38.2; *L. rhamnosus* S32.2; *L. fermentum* F39.3, CT45.2; *L. crispatus* CT56.4. Cada uno de los lactobacilos se incubó en las mismas condiciones en las que había sido aislado y pasadas 72 h se procedió a observar la presencia o ausencia de autólisis (Tabla 15). Aquellos microorganismos que secretan autolisinas forman un halo alrededor de la colonia debido a la hidrólisis del peptidoglicano presente en el medio de cultivo (Figura 18).



Figura 18. Efecto lítico de algunas cepas de lactobacilos sobre la pared celular de *L. oris* F12.19.

Todas las cepas testadas que mostraron autólisis pertenecían a las especies *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* y *L. fermentum*. En la Tabla 15 se puede observar que los lactobacilos con capacidad autolítica no parecen estar relacionados con el diagnóstico del paciente del que fueron aislados.

Tabla 15. Caracterización de la actividad autolítica en las distintas cepas de lactobacilos ensayadas.

Especie	Cepa	Autólisis
<i>L. reuteri</i>	F8.5	+
	CT46.4	+
<i>L. gasseri</i>	F8.7	+
	S32.3	+
	CA37.1	-
	F39.4	+
	CT61.2	+
<i>L. paracasei</i>	S19.9	-
	CT25.1	-
<i>L. oris</i>	F12.19	-
	CT56.2	-
<i>L. vaginalis</i>	CA37.2	+
	F44.1	+
<i>L. salivarius</i>	S32.1	-
	F38.2	-
<i>L. rhamnosus</i>	S32.2	-
<i>L. fermentum</i>	F39.3	+
	CT45.2	+
<i>L. crispatus</i>	CT56.4	-

2.4. Estudio de la especificidad de las lisinas

Es posible que las interacciones que tienen lugar entre los lactobacilos y las autolisinas sean más complejas y las lisinas producidas por los lactobacilos no sean específicas para la cepa que las produce sino que puedan actuar sobre la pared celular de otras cepas y/o especies. En este apartado nos planteamos testar varios lactobacilos no solo para ver su capacidad autolítica, sino también para analizar las posibles relaciones líticas entre cepas o especies. En el estudio se analizaron 28 cepas de lactobacilos, entre las que incluyeron las 19 cepas en las que había sido testada previamente su actividad autolítica. Para llevar a cabo este análisis se hicieron réplicas de los distintos lactobacilos en varias placas de MRS cada una de las cuales contenía las células autoclavadas de un lactobacilo sobre el cual se quería ensayar la lisis. Cada uno de los lactobacilos testados se incubó en las mismas condiciones en las que fue aislado y pasadas 72 h se procedió a observar la presencia o ausencia de lisis mediante la formación del halo hidrolítico tal y como se describe en el apartado anterior.

Gracias a este análisis pudimos determinar que aproximadamente el 60% de las cepas analizadas producen enzimas líticas y todas se engloban dentro de las especies *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. vaginalis* y *L. fermentum* (Tabla 16). En ningún caso las enzimas actúan de forma específica solo frente a la propia cepa que las produce. La enzima más restrictiva parece ser la de *L. vaginalis* F38.3 que solo es capaz de actuar frente a otra cepa de su misma especie. Dentro de las bacterias con actividad lítica, el 60% de las bacterias son capaces de producir la lisis de todos los lactobacilos sobre los que se testaron y el 40% solo produjo lisis sobre determinadas cepas. Aunque la producción de enzimas líticas pudiera ser una característica condicionada por la especie (podemos observar en ningún caso, *L. oris*, *L. paracasei*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus* o *L. crispatus* producen lisis), solo algunas cepas parecen expresar dicha actividad. Además, también parece que depende de la cepa y no de la especie la especificidad del microorganismo sobre el que actúa ya que por ejemplo si nos fijamos en *L. vaginalis* F12.9 vemos que lisa la pared celular de *L. gasseri* CA37.1 mientras que *L. vaginalis* F36.1 no lo hace. En ningún caso se observa una relación entre función hidrolítica y el diagnóstico del individuo del que se aisló el microorganismo. Igualmente, no parece existir una relación entre la producción de enzimas líticas y la degradación del 33-mer que habíamos observado previamente en el apartado 1 de Resultados y Discusión (Tabla 17) ya que se observan los cuatro casos posibles: i) microorganismos que digieren el 33-mer y no producen lisinas; ii) microorganismos que digieren el 33-mer y producen lisinas; iii) microorganismos que no digieren el 33-mer pero si producen lisinas; iv) microorganismos que ni digieren el 33-mer ni producen lisinas.

Está claro que los microorganismos englobados en los grupos i y iv no producen lisinas y por lo tanto estas no pueden estar relacionadas de ninguna forma con la degradación del 33-mer. Sin embargo, en el caso de las cepas que sí producen lisinas pero no hidrolizaron el 33-mer podrían estar ocurriendo tres situaciones:

- No existe una relación entre la producción de enzimas líticas y la liberación de enzimas intracelulares que hidrolicen el 33-mer.
- Sí existe una relación, pero el momento en el que se tomó la muestra para analizar la degradación del 33-mer no fue el adecuado.
- Estas cepas no producen enzimas intracelulares.

Tabla 17. Presencia de enzimas líticas e hidrólisis del 33-mer de lactobacilos seleccionados.

Especie	Cepa	Hidrólisis del 33-mer	Autólisis	Lisis de otros microorganismos
<i>L. reuteri</i>	F8.5	-	+	+
	F12.7	-	ND	-
	CT46.4	-	+	+/-
<i>L. gasseri</i>	F8.7	-	+	+
	F12.4	-	ND	+
	S32.3	-	+	+
	CA37.1	-	-	-
	F38.1	-	ND	-
	F39.4	+	+	+
	S59.1	-	ND	+
	CT61.2	-	+	+/-
<i>L. vaginalis</i>	F12.9	-	ND	+/-
	F36.1	-	ND	+/-
	CA37.2	-	+	+/-
	F38.3	-	ND	+/-
	F44.1	+	+	+
	F44.3	-	ND	+/-
	CT56.2	-	-	-
	CT61.1	-	ND	+
<i>L. oris</i>	F12.19	+	-	-
<i>L. paracasei</i>	S19.9	-	-	-
	CT25.1	-	-	-
<i>L. salivarius</i>	S32.1	+	-	-
	F38.2	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	S32.2	+	-	-
<i>L. fermentum</i>	F39.3	+	+	+
	CT45.2	-	+	+
<i>L. crispatus</i>	CT56.4	-	-	-

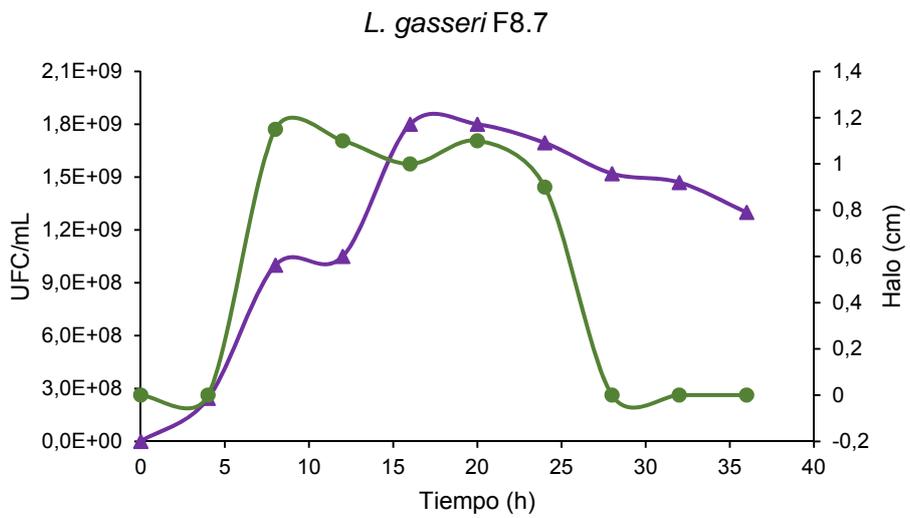
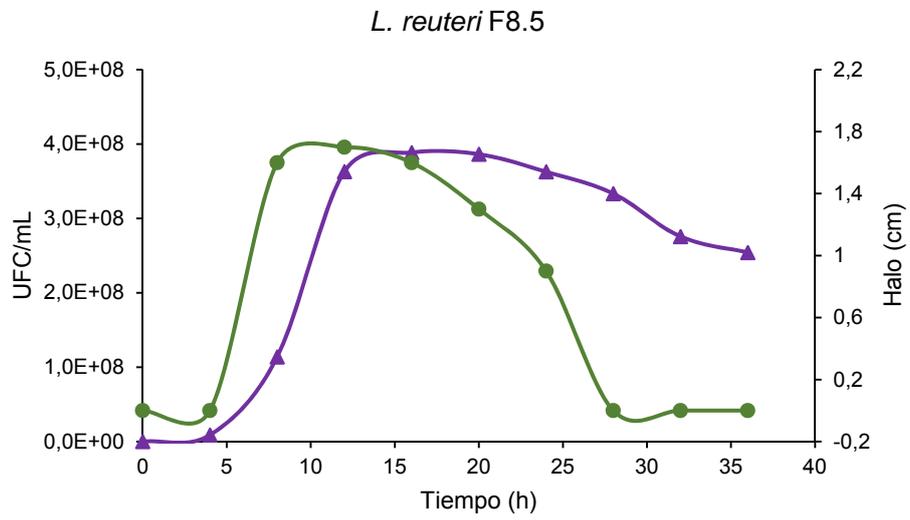
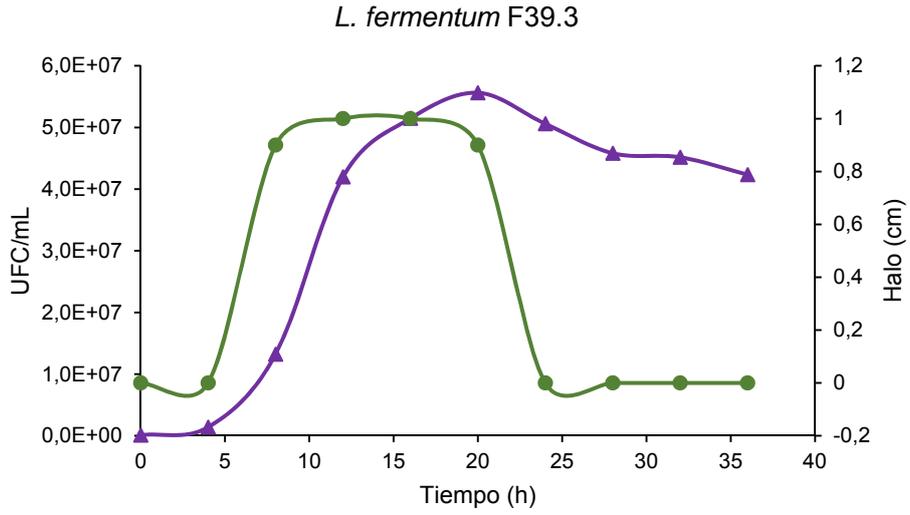
2.5. Relación entre la producción de autolisinas y la hidrólisis del 33-mer empleando MRS como medio de crecimiento

Para establecer si es cierto que existe una relación entre la autólisis y la degradación del 33-mer pero el momento en el que se tomó la muestra para este último análisis no fue el adecuado, decidimos incubar con el 33-mer muestras tomadas del cultivo en distintos puntos de la producción de las autolisinas. Debido a que el método empleado para determinar la autólisis requiere un tiempo de incubación, no es inmediato, lo primero que necesitamos es establecer una relación entre la producción de autolisinas y la DO del cultivo. De esta forma, podremos seleccionar los puntos de análisis en función de la DO.

Este estudio se realizó con cuatro lactobacilos que habían mostrado previamente autólisis, y todos obtenidos de familiares de celíacos: *L. fermentum* F39.3, *L. gasseri* F39.4, *L. gasseri* F8.7 y *L. reuteri* F8.5. Los dos primeros habíamos visto que digerían el 33-mer y los otros dos no.

Para establecer la relación entre la producción de autolisinas y la DO_{600} del cultivo se inocularon colonias aisladas de los microorganismos seleccionados para el estudio en 10 mL de MRS líquido y se incubaron a 100 rpm y 37 °C. Una vez alcanzada $DO_{600}1$, se inocularon a partir de estos cultivos 50 mL de MRS, y se crecieron en las mismas condiciones. Entre los tiempos 0 y 36 h en intervalos de 4 h se extrajeron dos alícuotas de cada uno de los cultivos. Una alícuota fue empleada para medir la DO. La otra alícuota se centrifugó a 10000 xg durante 5 min. Se añadieron 100 μ L del sobrenadante en placas de bioensayo de autólisis que contenían MRS y las células autoclavadas del microorganismo a testar. Los bioensayos se incubaron a 37 °C durante 24 h. Para su representación gráfica, cuando los cultivos alcanzaron $DO_{600} 1$ se hicieron varias diluciones y se plaquearon en MRS. Tras 48 h a 37 °C se procedió al recuento de colonias y se estableció la relación entre DO y UFC/mL.

En la Figura 19 se puede apreciar que no existe una diferencia notable entre las distintas cepas en cuanto a la curva de crecimiento y a la producción de autolisinas. En todos los casos la autólisis comienza durante la fase exponencial de crecimiento, y se mantiene durante 12-20 h dependiendo de la cepa, momento tras el cual deja de detectarse por completo. El momento en el cual desaparece la autólisis coincide en todos los casos con la fase estacionaria de crecimiento.



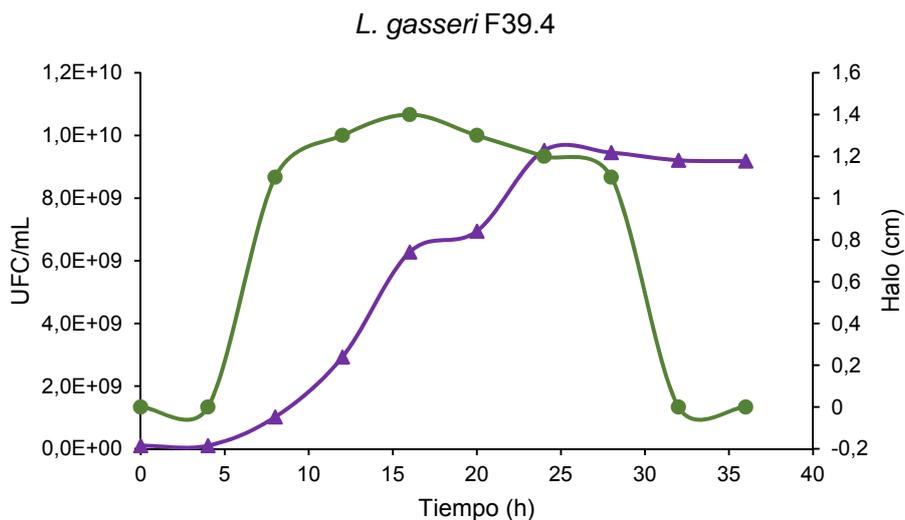


Figura 19. Relación entre la fase de crecimiento (—▲—) y la producción de autolisinas (—●—) de *L. fermentum* F39.3, *L. reuteri* F8.5, *L. gasseri* F8.7, *L. gasseri* F39.4.

Teniendo en cuenta estos resultados, se volvieron a crecer los microorganismos en las mismas condiciones y se seleccionaron tres puntos distintos de la curva de autólisis para analizar mediante HPLC la degradación del 33-mer en función de la presencia de autolisinas.

A tiempos 8, 20 y 36 h se añadieron 3,4 μ L de los cultivos a 60 μ M de 33-mer en PBS pH 7,3 en un volumen final de 40 μ L y las reacciones se incubaron a 37 °C durante 24 h, tiempo tras el cual se procedió a su análisis mediante HPLC.

Los cromatogramas obtenidos mostraron que ninguno de los microorganismos ensayados, cualquiera que fuese el punto de la curva de autólisis en el que se tomó la muestra, hidrolizan el 33-mer (Datos no mostrados).

2.6. Determinación de la localización celular de la enzima con actividad peptidolítica frente al 33-mer

El objetivo de este apartado fue analizar si podemos descartar que exista una relación entre producción de autolisinas e hidrólisis de 33-mer, o si lo que podría estar ocurriendo es que determinadas cepas o en determinadas ocasiones no se producen enzimas intracelulares con la capacidad para lisar este péptido. Para ello lo primero que se hizo fue determinar el mejor método para lisar la pared celular y liberar el contenido intracelular. Para llevar a cabo este ensayo se seleccionaron cinco cepas de *L. gasseri*

(por ser el microorganismo que apareció con más frecuencia tanto en cultivo de biopsias duodenales como en DGGE) y se lisó por métodos enzimáticos (lisozima) y mecánicos (molino de bolas y sonicación) siguiendo los métodos descritos en Materiales y Métodos en el apartado 4.4. A pesar de no producir enzimas líticas, *L. gasseri* CA37.1 fue incluido en el estudio para poder determinar si tiene enzimas peptidolíticas intracelulares frente al 33-mer que pudieran ser liberadas cuando las lisinas de otros microorganismos degraden su pared celular. Una vez lisados los cultivos se plaquearon en MRS y se incubaron durante 48 h en las mismas condiciones en las que fueron aislados, tras lo cual se procedió al recuento de colonias (Tabla 18). De forma complementaria, se observó el estado de las células mediante microscopía (Figura 20). En todos los casos la lisis enzimática mostró mejores resultados, por lo que fue seleccionada como método de lisis para este estudio.

Tabla 18. Recuento de colonias tras la ruptura celular por distintos métodos de lisis.

Cepa de <i>L. gasseri</i>	UFC/mL			
	Control negativo	Lisozima	Sonicación	Molino de bolas
F8.7	$1,5 \times 10^7$	11	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
CA37.1	$2,0 \times 10^6$	900	$1,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
F39.4	$5,1 \times 10^8$	142	$4,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
S59.1	$5,0 \times 10^7$	2	$2,7 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
CT61.2	$1,7 \times 10^7$	69	$7,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$

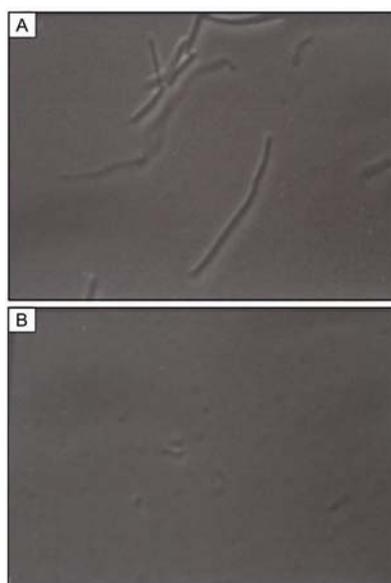


Figura 20. Imagen tomada mediante microscopía 100X como resultado de la lisis por métodos mecánicos (A) y métodos enzimáticos (B).

Una vez tomada esta decisión, se lisó mediante lisozima un cultivo crecido en MRS de cada una de las cinco cepas de *L. gasseri*, y se incubó con el 33-mer el pellet por un lado y el sobrenadante por otro, así como con un control que consistió en el cultivo inicial. La estabilidad del 33-mer se analizó por HPLC, y se observó que en ningún caso el 33-mer había sido hidrolizado (Tabla 19).

Tabla 19. Hidrólisis del 33-mer tras su incubación con varias fracciones del cultivo de distintos *L. gasseri* crecidos en medio MRS sin gluten.

	Hidrólisis 33-mer tras cultivo en MRS				
	F8.7	CA37.1	F39.4	S59.1	CT61.2
Cultivo intacto	-	-	-	-	-
Pellet	-	-	-	-	-
Sobrenadante	-	-	-	-	-

Como la hidrólisis del 33-mer descrita en el apartado 1.4 se había observado tras crecer los lactobacilos en un medio con gluten, este mismo experimento se repitió pero suplementando al medio MRS con 0,5% de gluten para estimular la actividad degradadora de esta proteína. En este caso, sí se pudo observar degradación total del 33-mer, pero solo cuando se incubaba con el sobrenadante resultado de la lisis enzimática de la pared celular de la cepa F39.4 (Figura 21, Tabla 20).

Tabla 20. Hidrólisis del 33-mer tras su incubación con varias fracciones del cultivo de distintos *L. gasseri* crecidos en medio MRS con gluten.

	Hidrólisis 33-mer tras cultivo en MRS+0,5% gluten				
	F8.7	CA37.1	F39.4	S59.1	CT61.2
Cultivo intacto	-	-	-	-	-
Pellet	-	-	-	-	-
Sobrenadante	-	-	+	-	-

Estos resultados parecen indicar que la enzima capaz de hidrolizar el 33-mer de los lactobacilos es intracelular, y no es dependiente de especie sino de cepa. Además, se ha comprobado que la producción de la enzima con actividad peptidolítica frente al 33-mer es estimulada por la presencia de gluten en el medio. Estos datos corroboran lo que ya habíamos visto previamente; de todos los *L. gasseri* aislados de biopsia duodenal solo F39.4 digiere el 33-mer.

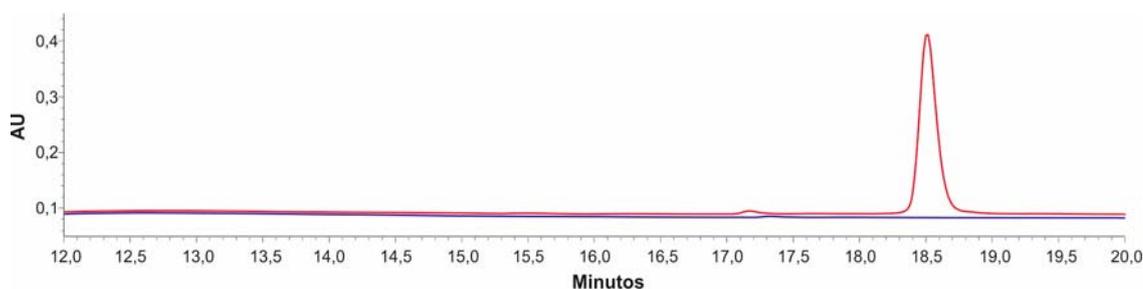


Figura 21. En azul se muestra el cromatograma resultado de la incubación del sobrenadante de *L. gasseri* F39.4 tras haber sido lisado mediante lisozima. La línea roja representa el control negativo, el 33-mer.

2.7. Relación entre la producción de autolisinas y la hidrólisis del 33-mer empleando MCG como medio de crecimiento

Se ha observado que la actividad degradadora del 33-mer es producida por enzimas intracelulares y es estimulada por la presencia de gluten en el medio. Por lo tanto, los experimentos realizados hasta el momento no son suficientes para poder establecer una relación entre la autólisis y la degradación del 33-mer. Para poder confirmar o descartar la hipótesis de que las variaciones observadas en la degradación del 33-mer puedan estar directamente relacionadas con la producción de autolisinas, se procedió a repetir el experimento descrito en el apartado 2.5 de Resultados y Discusión con la diferencia de que esta vez se añadió gluten al medio de crecimiento. Se seleccionó *L. gasseri* F39.4 como modelo de estudio.

Se inoculó una colonia aislada de *L. gasseri* F39.4 en 10 mL de MCG-3 y se incubó a 100 rpm y 37 °C durante 24 h. Posteriormente 250 µL de este cultivo se usaron para inocular 50 mL de MCG-3 que se incubó en las mismas condiciones. A distintos tiempos entre 0 y 48 h se extrajeron dos alícuotas de cada uno de los cultivos. Una de las alícuotas se empleó para hacer diluciones seriadas y sembrar en MRS sólido con el fin de realizar una curva de crecimiento. Tras 48 h a 37 °C en condiciones microóxicas se procedió al recuento de colonias. La otra alícuota se centrifugó a 10000 xg durante 5 min y se añadieron 100 µL del sobrenadante en placas de bioensayo de autólisis que contenían MRS y células autoclavadas de *L. gasseri* F39.4. Además a cada uno de los tiempos se incubó una muestra del cultivo con el 33-mer durante 24 h a 37 °C para analizar posteriormente la estabilidad del 33-mer mediante HPLC.

Como se puede observar en la Figura 22, al igual que ocurría al crecer el microorganismo en MRS, las autolisinas comienzan a producirse durante la fase exponencial. Sin embargo, al crecer *L. gasseri* F39.4 en MCG-3, una vez alcanzado el

pico de autólisis a las 8 h de crecimiento, la actividad autolítica comienza a disminuir hasta las 24 h; tiempo que coincide con una gran disminución del número de UFC en el cultivo. Curiosamente a partir de este tiempo, la actividad autolítica comienza a aumentar alcanzando a las 48 h una actividad elevada, igual que la producida a las 8 h. Una posible explicación podría ser que el microorganismo una vez que ha agotado los nutrientes disponibles del medio, como mecanismo de supervivencia produce autolisinas para intentar disminuir drásticamente su población y así poder mantenerse hasta la llegada de nuevos nutrientes que le permitan volver a crecer. Otra diferencia respecto al crecimiento en MRS, es que al crecerlo en MCG-3, cuando la actividad autolítica disminuye lo hace hasta valores bajos, pero en ningún caso desaparece por completo.

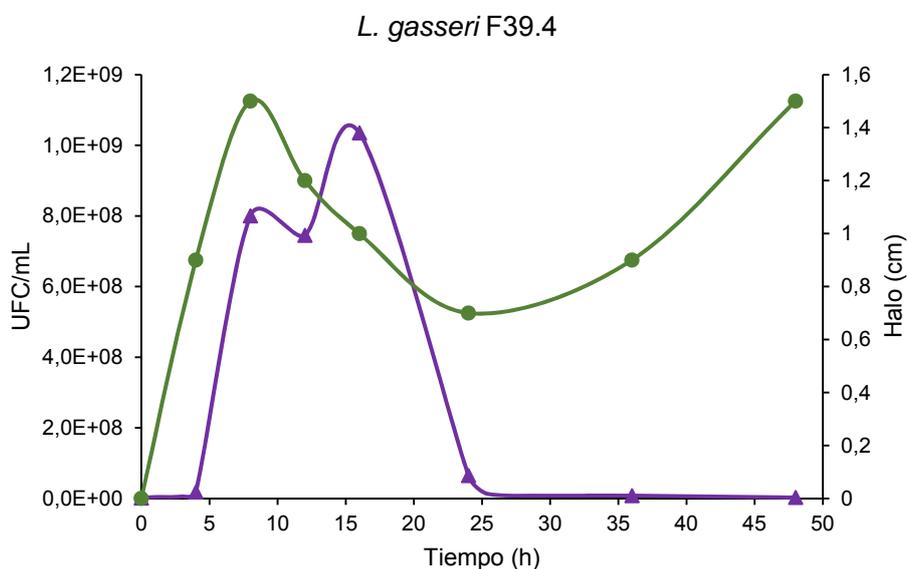


Figura 22. Relación entre la fase de crecimiento (—▲—) y la producción de autolisinas (—●—) de *L. gasseri* F39.4.

El análisis de degradación del 33-mer muestra que el péptido es hidrolizado por completo a los tiempos 8, 12 y 48 h mientras que permanece intacto a los demás tiempos estudiados. Precisamente son a esos tiempos (8, 12 y 48 h) a los que se midió por bioensayo una mayor actividad autolítica. Aunque solo se ha estudiado en detalle *L. gasseri* F39.4, los resultados obtenidos parecen indicar que si existe una relación entre la producción de autolisinas por los lactobacilos y la degradación del péptido 33-mer. Las enzimas peptidolíticas una vez liberadas al medio, parece que podrían ser poco estables; eso explicaría que las enzimas que se encuentran en el medio y digieren el 33-mer a tiempo 12 h, no son activas a tiempo 16 h. Lo que nos condujo en primer lugar a estudiar si existía una relación entre la lisis de los lactobacilos y la degradación del 33-mer fue el hecho de que en el ensayo preliminar que se llevó a cabo con todas

las bacterias aisladas de biopsia duodenal los lactobacilos mostraban resultados variables. Estas variaciones podrían deberse a pequeñas diferencias en el crecimiento entre los distintos días (por la temperatura ambiente a la que se encontraba el medio de cultivo, la colonia a partir de la cual se hizo el inóculo...), que llevó a la toma de muestra en distintos puntos de la producción de autolisinas. Esto condujo a que en unos casos las enzimas con actividad peptidolítica se encontrasen intracelularmente y no pudieran acceder al 33-mer, y en otros casos hubieran sido liberadas al medio extracelular y digirieran el péptido.

En aquellos lactobacilos capaces de hidrolizar el 33-mer, pero que sin embargo no producen autolisinas lo que podría estar ocurriendo es que tengan otros mecanismos de regulación que causen su lisis o simplemente mueran cuando se acaban los nutrientes, liberando al medio el contenido intracelular incluyendo las enzimas degradadoras del 33-mer.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTENÁSICA EXTRACELULAR DE *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 Y *Ser. marcescens* CECT 846

Hasta la fecha, el único tratamiento aceptado para el tratamiento de la EC es llevar a cabo una DSG de por vida. Sin embargo, cumplir con este requisito no siempre es posible, ya que muchas veces el paciente celiaco consume trazas de gluten de forma inadvertida. Por esta razón es importante la búsqueda de alternativas, una de las cuales es el uso de enzimas capaces de eliminar las trazas de gluten. Hasta este momento hay varias enzimas en diversas fases de estudio, pero ninguna ha sido aceptada aún como alternativa o complemento a la DSG.

Mediante el cultivo de biopsias hemos encontrado al menos 10 especies de bacterias distintas capaces de hidrolizar por completo el 33-mer. De todos los microorganismos que poseen esta actividad peptidolítica se seleccionaron *Bacillus pumilus* CT56.5, *Stenotrophomonas maltophilia* CA18.5 y *Pseudomonas aeruginosa* CT46.1 para estudiarlos más en profundidad. El motivo para seleccionar estos microorganismos y no otros, es que no solo hidrolizan el 33-mer, sino que también muestran actividad proteolítica extracelular frente al gluten cuando se crecen en MCG-3 y MCG-1 (Figura 23). Por lo tanto, producen enzimas que tienen una gran actividad hidrolítica frente al gluten y además son secretadas al medio, lo que facilita su estudio.

Además en este apartado también nos propusimos buscar una nueva enzima con actividad hidrolítica frente al gluten en un ecosistema distinto al tubo digestivo humano. Para ello, se hizo un *screening* a partir de varias cepas cedidas por la colección de cultivos del Área de Microbiología de la Universidad de León. El método de selección consistió en crecer las cepas en MCG-1, un medio que contiene gluten como única fuente de nitrógeno, y observar la formación de un halo de degradación de gluten alrededor de la colonia. De entre todas las cepas testadas, se seleccionó *Serratia marcescens* CECT 846 por mostrar un mejor crecimiento en MCG-1, y por hidrolizar el gluten (Figura 23).

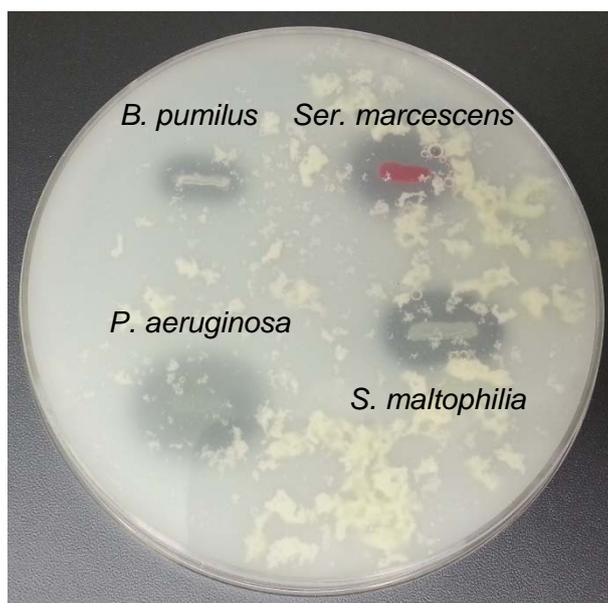


Figura 23. Crecimiento e hidrólisis de gluten en MCG-1 de *Ser. marcescens* CECT 846, *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *B. pumilus* CT56.5.

3.1. Estudio del crecimiento empleando gluten como fuente de nitrógeno en *Ser. marcescens* CECT 846, *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *B. pumilus* CT56.5

El primer paso para la caracterización fue observar a qué temperaturas y pHs podían crecer los distintos microorganismos en medios con gluten. Además de proporcionar una información básica, este ensayo nos permitiría en caso de detectar alguna diferencia muy notable, poder ajustar las condiciones de incubación de los microorganismos y así favorecer una mayor producción de la actividad enzimática extracelular para el resto de ensayos.

Para determinar el rango de temperatura de crecimiento, los microorganismos se crecieron en MCG-1 a pH 6,5. Las placas se incubaron a temperaturas entre 10 y 60 °C. Para determinar el rango de pH de crecimiento, los microorganismos se sembraron en MCG-1 tamponado entre pH 2 y pH 12. Las placas se incubaron a 37 °C. Tras 24 h se observó la presencia o ausencia de crecimiento.

B. pumilus CT56.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *Ser. marcescens* CECT 846 fueron los microorganismos que mostraron un mayor rango de temperaturas de crecimiento (de 20 a 50 °C). *S. maltophilia* CA18.5 creció a temperaturas entre 20 y 40 °C (Tabla 21).

Sin embargo, cuando analizamos el crecimiento a distintos pH, vemos que el microorganismo más restrictivo es *B. pumilus* CT56.5, ya que solo es capaz de crecer a pH entre 6 y 8. Tanto *S. maltophilia* CA18.5 como *P. aeruginosa* CT46.1 tienen un amplio rango de pH de crecimiento que va desde pH 5 hasta pH 10. *Ser. marcescens* CECT 846 crece entre pH 6 y 10 (Tabla 22).

Aunque no se puede medir de forma precisa, se estimó a simple vista que las mejores temperaturas para el crecimiento de los cuatro microorganismos se situaban entre los 30 y 37 °C y los mejores pH entre 6 y 8. Mediante esta observación, se estableció que para llevar a cabo el resto de experimentos enfocados a la caracterización de las actividades enzimáticas, los microorganismos se crecerían en MCG-1 (pH 6,5) a 37 °C. En todos los casos que hubo crecimiento también se produjo hidrólisis de gluten, observada mediante la formación de un halo transparente alrededor de la colonia como el que se mostró anteriormente en la Figura 23.

Tabla 21. Temperaturas de crecimiento de *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *Ser. marcescens* CECT 846.

		Microorganismo			
		<i>B. pumilus</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Ser. marcescens</i>
Temperatura	10	X	X	X	X
	20	✓	✓	✓	✓
	30	✓	✓	✓	✓
	37	✓	✓	✓	✓
	40	✓	✓	✓	✓
	50	✓	X	✓	✓
	60	X	X	X	X

Tabla 22. pHs de crecimiento de *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *Ser. marcescens* CECT 846.

		Microorganismo			
		<i>B. pumilus</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Ser. marcescens</i>
pH	2	X	X	X	X
	3	X	X	X	X
	4	X	X	X	X
	5	X	✓	✓	X
	6	✓	✓	✓	✓
	7	✓	✓	✓	✓
	8	✓	✓	✓	✓
	9	X	✓	✓	✓
	10	X	✓	✓	✓
	11	X	X	X	X
	12	X	X	X	X

3.2. Estudio de las actividades glutenásicas en función de la temperatura y del pH

El objetivo de este apartado fue determinar los rangos de temperatura y pH a los que eran activas las actividades enzimáticas degradadoras de gluten de los distintos microorganismos, para así poder valorar junto con los datos aportados por el resto de estudios el posible interés que pueden tener estas actividades para su aplicación en el campo de la celiacía.

Habíamos visto que los microorganismos objeto de este estudio secretan las proteasas con actividad glutenásica al medio de cultivo. Por lo tanto, son proteasas extracelulares. Esto nos permitió analizar mediante bioensayo tanto los rangos de temperatura y pH, como la temperatura y el pH óptimo de dichas actividades. Lo primero que se hizo fue estudiar la relación entre el crecimiento del microorganismo y la producción de enzima con actividad glutenásica. Para ello se inoculó una colonia aislada de cada uno de los microorganismos en MCG-1 líquido, se incubó a 37 °C y se extrajeron alícuotas a distintos tiempos entre 0 y 24 h. Los sobrenadante una vez filtrados se añadieron a placas de bioensayo con MCG-1. Se determinó que la mayor actividad glutenásica en todos los casos se producía tras 24 h de cultivo (Figura 24).

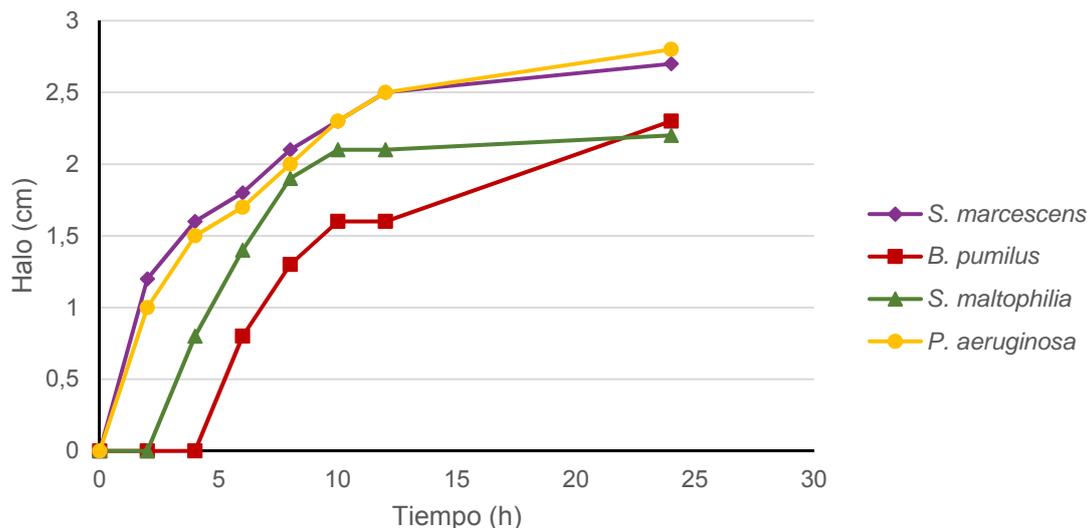


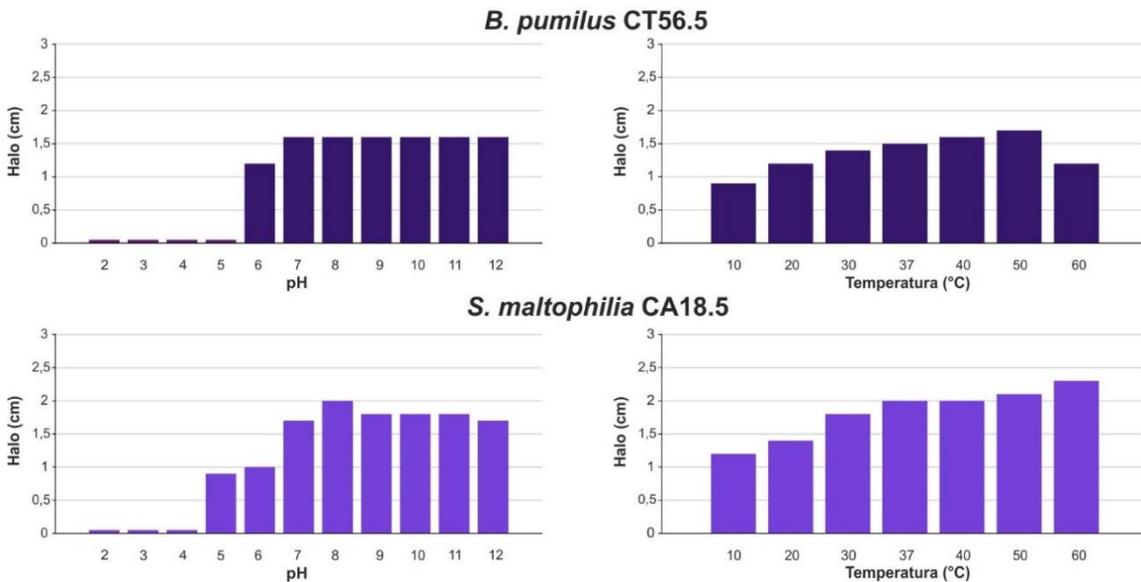
Figura 24. Producción de enzimas con actividad glutenásica en medio MCG-1 en cultivos de *Ser. marcescens* CECT 846, *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1.

Se inoculó una colonia aislada de cada uno de los microorganismos a partir de un cultivo puro en 10 mL de MCG-1 y se incubó durante 24 h a 200 rpm y 37 °C. Posteriormente 50 μ L de este cultivo se usaron para inocular 10 mL de MCG-1 que se incubó en las mismas condiciones. Los sobrenadantes se recogieron, tras 24 h de incubación, por centrifugación a 16000 xg durante 10 min y filtración por 0,22 μ m para eliminar la carga bacteriana. La actividad glutenásica se determinó mediante bioensayo en MCG-1. Los bioensayos se incubaron durante 24 h en una estufa en las siguientes condiciones: a) para el análisis de actividad a distintos pHs la temperatura de incubación fue 37 °C; b) para el análisis de actividad a distintas temperaturas, cada una de los bioensayos se incubó a 10, 20, 30, 37, 40, 50 y 60 °C. Tras las 24 h de incubación se midieron los diámetros de los halos de degradación generados alrededor de los pocillos.

El rango de pH de actividad es similar para las actividades glutenásicas de los cuatro microorganismos, aunque hay ciertas diferencias (Figura 25). Mientras que *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *Ser. marcescens* CECT 846 muestran actividad entre pH 5 y 12, la actividad de *B. pumilus* CT56.5 está inhibida a pH 5. *B. pumilus* CT56.5 produce el mismo halo de degradación entre los pH 6 y 12, sin mostrar un óptimo, por lo que la enzima actúa a pHs neutros-básicos. Aunque *S. maltophilia* CA18.5 tiene actividad a pH 5 y 6, esta es muy baja en comparación con los demás valores. El mayor halo de degradación para este microorganismo se observa a pH 8, lo que también nos inclina a pensar que la enzima responsable de dicha actividad pueda ser una proteasa alcalina. Lo mismo se podría decir de *P. aeruginosa* CT46.1,

aunque en este caso no es tan claro, porque aunque muestra una alta actividad a pH alcalinos, a pH 6 la actividad es similar, y la degradación óptima tiene lugar a pH 7. *Ser. marcescens* CECT 846 tiene el mismo patrón de comportamiento que *P. aeruginosa* CT46.1; tiene una alta actividad a pHs alcalinos pero a pH entre 5 y 7 también tiene una actividad notable. En este caso tiene el máximo de actividad a pH 8.

Fijándonos en el otro parámetro estudiado, las temperaturas, podemos observar que los tres microorganismos aislados de biopsias duodenales liberan al sobrenadante proteasas que son activas en todo el rango ensayado (10-60 °C) (Figura 25). Sin embargo, *Ser. marcescens* CECT 846 solo es activa entre 10 y 50 °C. Tanto en el caso de *B. pumilus* CT56.5 como de *P. aeruginosa* CT46.1, la actividad se ve incrementada con la temperatura, hasta llegar a un máximo a los 50 °C a partir de los cuales vuelve a descender. Esta bajada no se observa en el caso de *S. maltophilia* CA18.5 para la cual el aumento de la actividad es acorde al aumento de la temperatura hasta los 60 °C. En *Ser. marcescens* CECT 846 la actividad glutenásica se incrementa con la temperatura, hasta un máximo que se produce a 40 °C, y a 50 °C la actividad desciende notablemente.



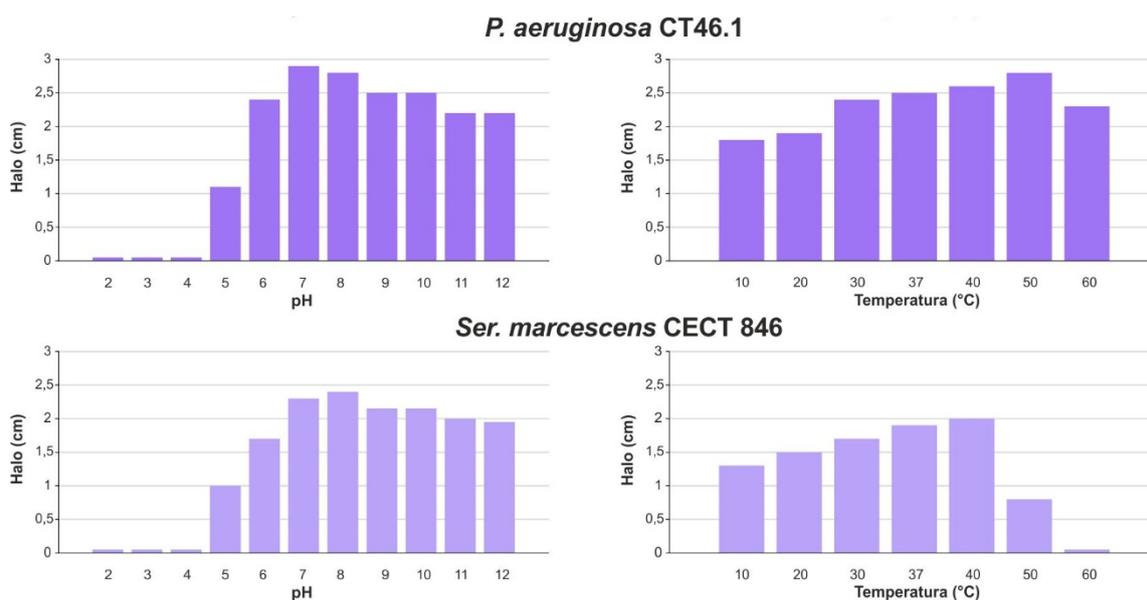


Figura 25. Rango de actividad glutenásica a distintas temperaturas y pHs en los sobrenadantes de cultivos con *Ser. marcescens* CECT 846, *S. maltophilia* CA18.5, *B. pumilus* CT56.5 y *P. aeruginosa* CT46.1.

3.3. Determinación de las actividades PEP y DPPIV

El gluten, una vez que es consumido se digiere por las enzimas del tracto gastrointestinal. Sin embargo, esta digestión es incompleta, ya que se generan péptidos ricos en prolina que no son sustrato para las enzimas digestivas. Estos péptidos pueden desencadenar la EC en aquellos individuos con susceptibilidad genética. Para saber si los microorganismos son potencialmente interesantes a la hora de degradar péptidos ricos en prolina, se analizó si tenían actividades PEP y/o DPPIV. Ambas son actividades degradadoras de péptidos con residuos de prolina. Para ello se creció cada uno de los cuatro microorganismos en 10 mL de MCG-1 y se incubó durante 24 h a 37 °C y a 200 rpm. Posteriormente, 50 µL de este cultivo se emplearon para inocular 10 mL de MCG-1 que se incubó en las mismas condiciones durante 24 h. Los cultivos fueron centrifugados a 16000 xg durante 5 min y los sobrenadantes se incubaron con los sustratos correspondientes para cada una de las actividades (Z-Gly-Pro-AMC para la actividad PEP y H-Gly-Pro-pNa para la actividad DPPIV). La elaboración de una recta a partir de distintas concentraciones de los sustratos nos permitió la cuantificación de estas actividades enzimáticas.

Ni *B. pumilus* CT56.5 ni *P. aeruginosa* CT46.1 presentaron ninguna de las actividades ensayadas. Sin embargo, *Ser. marcescens* CECT 846 sí que demostró tener actividad PEP (117 U/mL de cultivo), y *S. maltophilia* CA18.5 presentó tanto actividad PEP (908 U/mL de cultivo) como DPPIV (11 U/mL de cultivo) (Tabla 23).

Aunque la actividad PEP de *S. maltophilia* CA18.5 dio un valor superior al de *Ser. marcescens* CECT 846, esto no significa que la proteasa de *S. maltophilia* CA18.5 sea más potente, ya que no se sabe si la actividad detectada se debe a una única enzima en cada microorganismo y además, no se cuantificó la carga microbiana que había en el momento en que se recogieron los sobrenadantes ni la concentración de proteína.

Tabla 23. Actividades PEP y DPPIV.

	PEP (U/mL)	DPPIV (U/mL)
<i>B. pumilus</i> CT56.5	-	-
<i>S. maltophilia</i> CA18.5	908	11
<i>P. aeruginosa</i> CT46.1	-	-
<i>Ser. marcescens</i> CECT 846	117	-

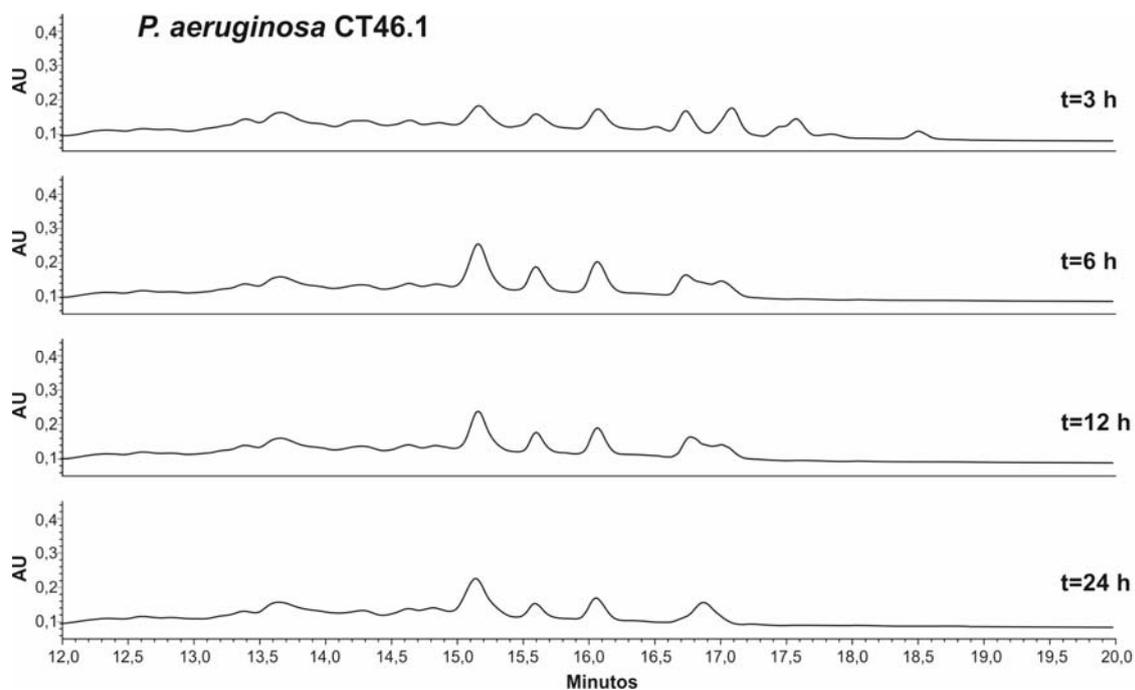
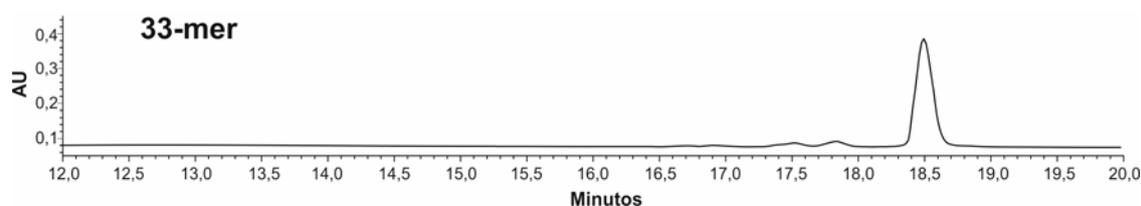
3.4. Estudio de la hidrólisis del 33-mer en función del tiempo de incubación

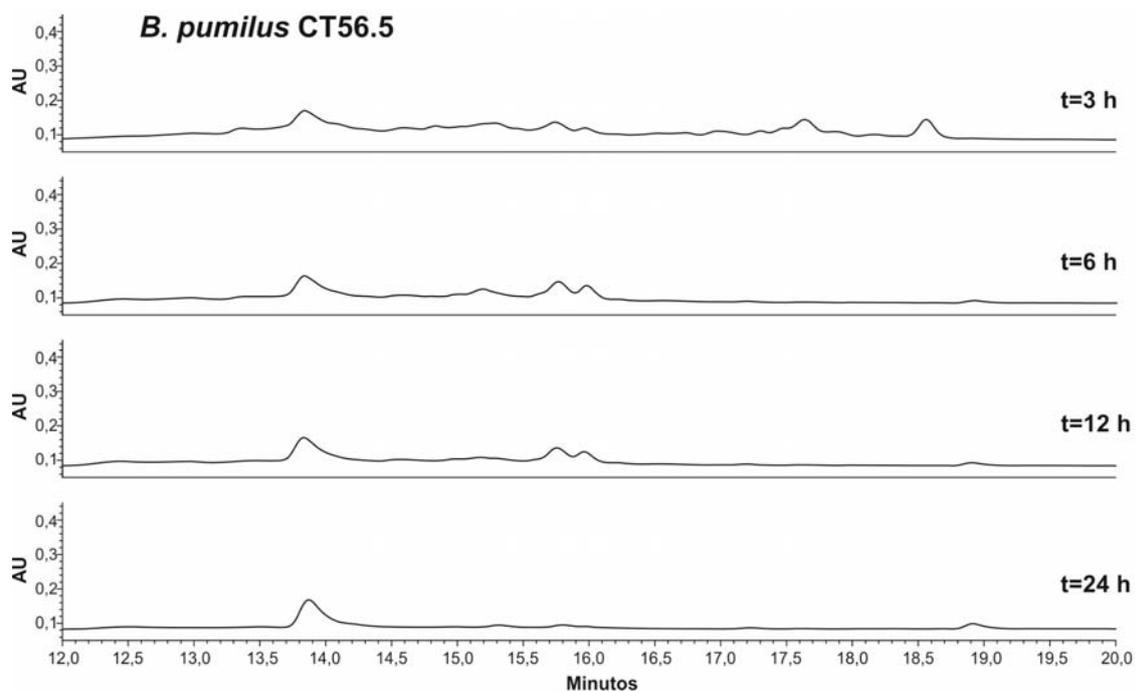
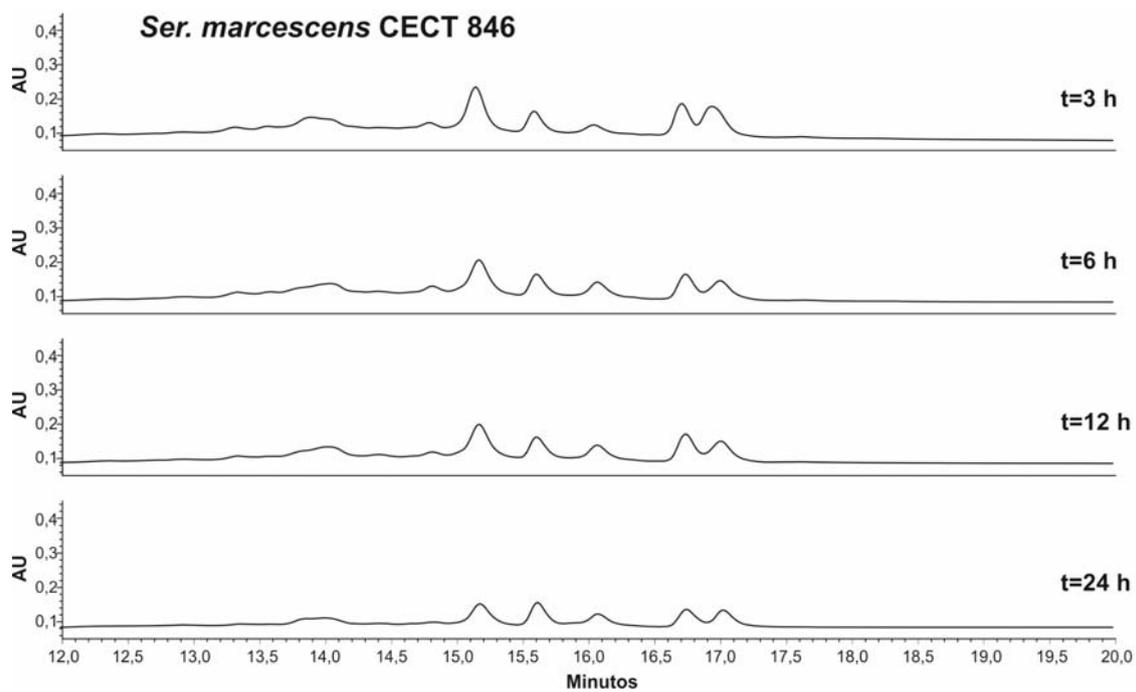
Como ya se ha comentado con anterioridad, es importante buscar microorganismos que puedan digerir el 33-mer, ya que este péptido es uno de los péptidos más inmunotóxicos en la enfermedad celiaca y no puede ser hidrolizado por las enzimas del tracto gastrointestinal humano. En el apartado 1.4 ya se había visto que *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1 eran capaces de hidrolizarlo en 24 h de incubación. Sin embargo, 24 h es un plazo de tiempo muy largo; ese primer ensayo simplemente era método de *screening* para hacer una selección preliminar. Lo que realmente interesa es que la hidrólisis sea efectiva y ocurra en el menor tiempo de incubación posible. Además también se quiso determinar si el nuevo microorganismo incluido en el estudio, *Ser. marcescens* CECT 846, hidroliza el 33-mer.

En este apartado nos propusimos analizar la degradación del 33-mer a distintos tiempos (0, 3, 6, 12 y 24 h). Para ello se crecieron los distintos microorganismos en MCG-1 durante 24 h. Posteriormente 50 µL de este cultivo se usaron para inocular 10 mL de MCG-3 que se incubó en las mismas condiciones durante 24 h. Con cada uno de los cultivos se prepararon 5 reacciones de incubación de 33-mer. Cada una de estas reacciones se paró a los distintos tiempos y se guardó a 4 °C. La estabilidad del 33-mer a los distintos tiempos fue analizada mediante HPLC.

Los resultados muestran distintos patrones de degradación en función del microorganismo estudiado (Figura 26). *Ser. marcescens* CECT 846 es capaz de hidrolizar por completo el 33-mer en tan solo 3 h. El aumento del tiempo de incubación parece tener poco efecto en los picos resultantes. *P. aeruginosa* CT46.1 tras 3 h de

incubación fue capaz de digerirlo en más de un 90%, y a partir de 6 h se observa una degradación completa. Los picos generados no parecen variar mucho con el aumento del tiempo de incubación. En los cromatogramas de *Ser. marcescens* CECT 846 y *P. aeruginosa* CT46.1, se puede observar que el patrón de picos generados por hidrólisis del 33-mer es similar. Sin embargo los perfiles de *B. pumilus* CT56.5 y *S. maltophilia* CA18.5 son muy distintos. Cuando se incuba con *B. pumilus* CT56.5, a las 3 h de incubación el pico correspondiente al 33-mer disminuye en un 90%, y a las 6 h la hidrólisis es del 100%. El incremento del tiempo de incubación hasta las 24 h produce que dos pequeños picos que se observaban anteriormente en torno al minuto 16 desaparezcan, y que aumente ligeramente un pico en el minuto 13,9. En el caso de *S. maltophilia* CA18.5 se puede observar cómo va disminuyendo el 33-mer con el paso del tiempo, pero no es hasta las 12 h de incubación que se puede considerar que el péptido desaparece por completo.





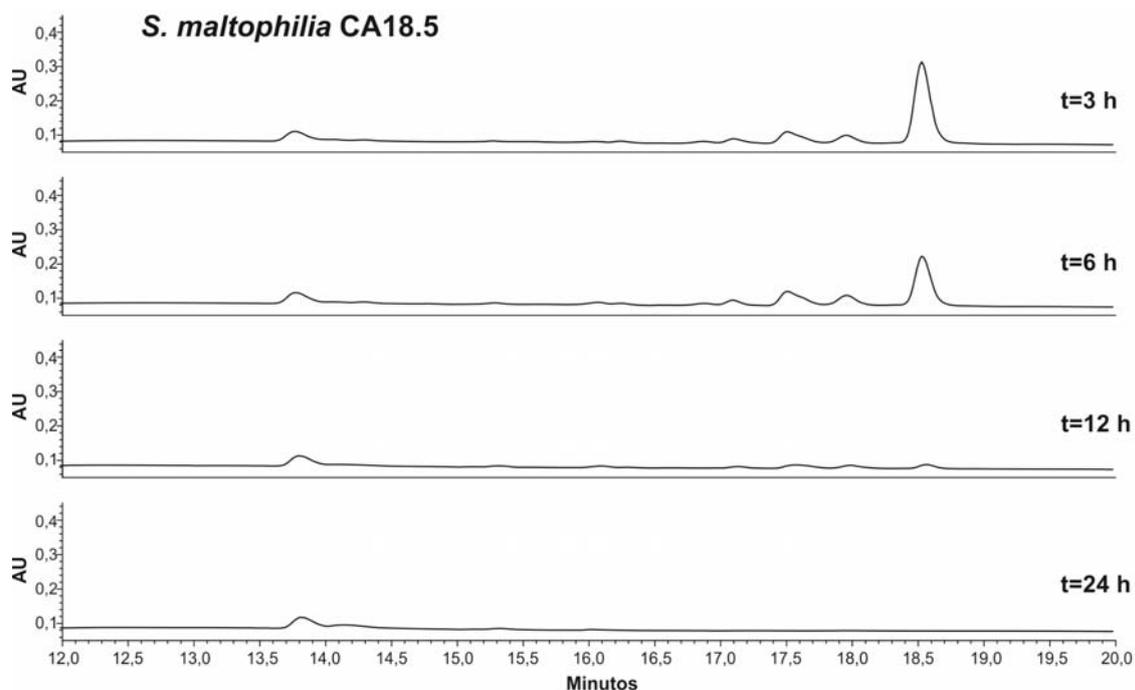


Figura 26. Perfiles de degradación del 33-mer obtenidos como resultado de su incubación durante distintos tiempos con cultivos de *P. aeruginosa* CT46.1, *Ser. marcescens* CECT 846, *B. pumilus* CT56.5 y *S. maltophilia* CA18.5.

3.5. Estudio de destoxificación del 33-mer puro

Hemos visto que los microorganismos seleccionados son capaces de degradar por completo el 33-mer, pero no sabemos si está hidrolizando sus epítomos tóxicos, o por el contrario está dejando estos epítomos intactos, y se están formando péptidos más pequeños pero igual o más tóxicos.

Para comprobar si además de digerir el 33-mer, son capaces de destoxificarlo, se llevó a cabo un análisis con el kit de ELISA *GlutenTox* que detecta específicamente los epítomos tóxicos del 33-mer. Las posibles interferencias entre el gluten del medio y el 33-mer se evitaron creciendo los microorganismos en MCGel que contiene gelatina en lugar de gluten.

Tras crecer los microorganismos durante 24 h en 10 mL de MCGel a 200 rpm y 37 °C, se añadieron 42,5 µL de los cultivos a una solución 10 µM de 33-mer en PBS en un volumen de 0,5 mL. La mezcla de reacción se incubó de nuevo en las mismas condiciones, y tras 24 h se procedió a realizar el ELISA.

El análisis mostró que los cuatro microorganismos eran capaces de reducir más de 1000 veces la concentración de los epítomos tóxicos del 33-mer (Tabla 24).

Tabla 24. Reducción de la concentración del 33-mer analizado mediante ELISA tras su incubación con cultivos de *S. maltophilia* CA18.5, *Ser. marcescens* CECT 846, *B. pumilus* CT56.5 y *P. aeruginosa* CT46.1.

Especie	Reducción de 33-mer
<i>S. maltophilia</i> CA18.5	10 μ M \rightarrow 0,007 μ M
<i>Ser. marcescens</i> CECT 846	10 μ M \rightarrow 0,004 μ M
<i>B. pumilus</i> CT56.5	10 μ M \rightarrow 0,001 μ M
<i>P. aeruginosa</i> CT46.1	10 μ M \rightarrow 0,006 μ M

3.6. Estudio de reducción de epítomos tóxicos en un cultivo con gluten

A pesar de ser capaces de destoxificar el 33-mer cuando este se encuentra puro en el medio, aún no sabemos la capacidad real que tienen estos microorganismos de eliminar los epítomos tóxicos presentes en un cultivo de gluten.

Para estudiar la degradación de gluten, cada microorganismo se creció en 10 mL de MCG-1 que contenía 30000 ppm de gluten inicial a 200 rpm y 37 °C durante 24 h. Posteriormente 150 μ L de este cultivo se emplearon para inocular 30 mL de MCG-1. Este nuevo cultivo se incubó en las mismas condiciones, y a los tiempos 0, 6, 12 y 24 h se tomaron alícuotas para su análisis mediante ELISA.

En la Figura 27 se muestra la representación de los datos que aparecen en la Tabla 25. En el caso de *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1, no hay datos para los tiempos 6 y 12 h ya que los valores obtenidos no entraron en la recta patrón. Como se puede observar, en 24 h los cuatro microorganismos reducen más de 500 veces la concentración de los epítomos tóxicos contenidos en el gluten inicial.

Tabla 25. Concentración de gluten a tiempos 0, 6, 12 y 24 h en cultivos de *Ser. marcescens* CECT 846, *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1 en MCG-1.

	Gluten (ppm)			
	t=0 h	t=6 h	t=12 h	t=24 h
<i>Ser. marcescens</i> CECT 846	30000	28476	7277	575
<i>B. pumilus</i> CT56.5	30000	29372	2048	433
<i>S. maltophilia</i> CA18.5	30000	-	-	80
<i>P. aeruginosa</i> CT46.1	30000	-	-	595

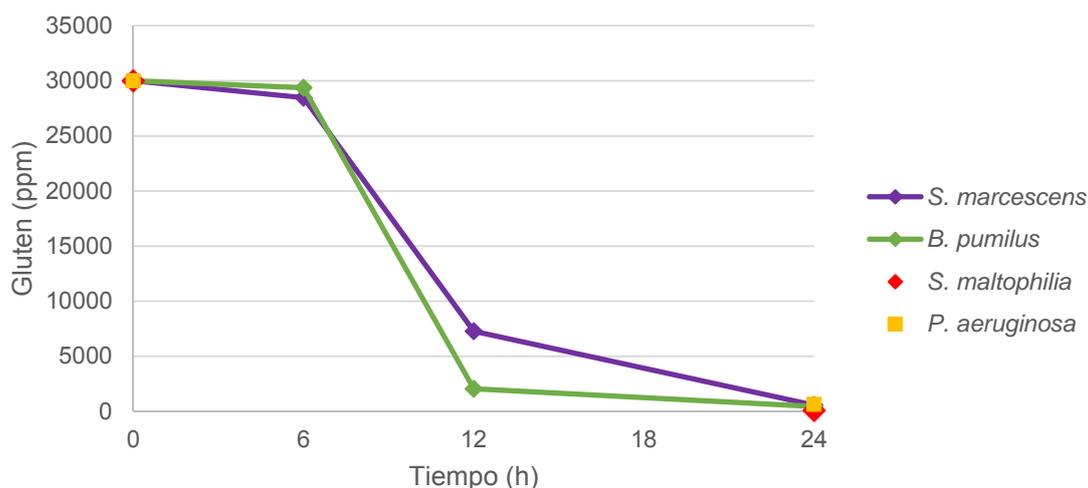


Figura 27. Curva de consumo de gluten en un cultivo inoculado con *Ser. marcescens* CECT 846, *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1. La cantidad inicial de gluten se ajustó a 30000 ppm.

3.7. Estudio de la actividad hidrolítica frente a los ATIs

Recientemente Junker *et al.*, han descrito que los ATIs son co-purificados junto con el gluten y al igual que este, son capaz de desencadenar la respuesta inmune característica de los individuos celíacos.

Gracias a la colaboración del Dr. Schuppan, durante una estancia en su laboratorio en Mainz (Alemania), se pudo analizar si los cuatro microorganismos seleccionados eran capaces no solo de hidrolizar el gluten, sino también los ATIs.

Para llevar a cabo este estudio se crecieron *Ser. marcescens* CECT 846, *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1 en LB (para evitar que el gluten del medio interfiriese con el ensayo) y posteriormente se incubaron con 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ATIs y se tomaron alícuotas a las 4 y 16 h que fueron centrifugadas y su sobrenadante recogido para el análisis mediante *Western Blott*. Los anticuerpos empleados para detectar los ATIs fueron producidos frente a dos de las fracciones más abundantes que los componen: CM3 y 0.19. Como control positivo se añadió una solución de ATIs, y como control negativo se añadieron los cultivos bacterianos sin ATIs.

En la Figura 28 se puede observar que *Ser. marcescens* CECT 846, *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1 son capaces de degradar la fracción CM3 a las 16 h de incubación. El microorganismo que lo hace de forma más eficaz es *P. aeruginosa* CT46.1, seguido por *S. maltophilia* CA18.5 y *Ser. marcescens* CECT 846. Respecto a

la fracción 0.19, vemos que hay dos bandas. Mientras que la banda inferior corresponde a proteínas monoméricas de ~14 kDa, la banda superior corresponde con asociaciones dimericas de ~28 kDa. Solo *Ser. marcescens* CECT 846 y en menor medida *S. maltophilia* CA18.5 parecen hidrolizar en parte la fracción 0.19.

Aunque mediante *Western Blott* observamos los diversos grados de degradación de los ATIs, es necesario llevar a cabo otra serie de estudios complementarios que demuestran la eficacia de estas bacterias para eliminar su toxicidad.

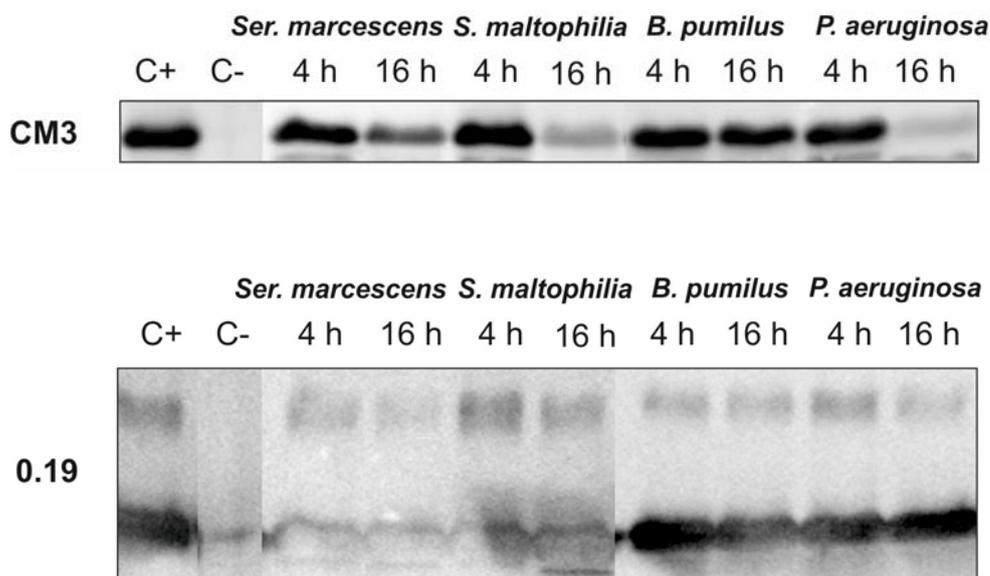


Figura 28. Análisis mediante *Western Blott* de la degradación de las fracciones de ATIs CM3 y 0.19 a distintos tiempos por *Ser. marcescens* CECT 846, *S. maltophilia* CA18.5, *B. pumilus* CT56.5 y *P. aeruginosa* CT46.1. C+: control positivo. C-: control negativo.

3.8. Identificación de las enzimas responsables de la actividad glutenásica

La identificación de las proteasas con actividad glutenásica de *Ser. marcescens* CECT 846 y *S. maltophilia* CA18.5 se realizó mediante SDS-PAGE y zimografía en geles de gliadina. En el caso de *B. pumilus* CT56.5 y *P. aeruginosa* CT46.1 las pruebas realizadas no concluyeron con éxito y no se pudieron identificar sus proteasas.

Para obtener la muestra objeto de estudio, se inoculó una colonia en 10 mL de MCG-1 y se creció durante 24 h a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, 50 µL de este cultivo se usaron para inocular 10 mL de MCG-1 que se incubó en las mismas condiciones durante 24 h. Para obtener los sobrenadantes, los cultivos se centrifugaron a 16000 xg, y se filtraron empleando filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,22

μm . En el caso de *S. maltophilia* CA18.5, para poder observar la proteína mediante SDS-PAGE, fue necesario concentrar el sobrenadante 100X.

Cada uno de los sobrenadantes fue sometido a dos electroforesis paralelas en dos geles de poliacrilamida al 10%. Una vez finalizada la electroforesis, uno de los geles se tiñó y las proteínas se revelaron como bandas oscuras sobre un fondo transparente. El otro gel se puso en contacto con una cobertera de gliadina toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se tiñó la cobertera, y la/s banda/s de actividad se revelaron como bandas transparentes sobre un fondo oscuro, debido a la hidrólisis de la gliadina. Comparando la posición de estas bandas de actividad con el gel que se había teñido directamente, se pudo determinar qué bandas se correspondían con las proteínas responsables de la hidrólisis de la gliadina.

3.8.1. Identificación de la enzima con actividad glutenásica de *Ser. marcescens* CECT 846

A partir del sobrenadante de *Ser. marcescens* CECT 846 pudimos determinar que la banda de actividad se correspondía con una única proteína de ~50 kDa (Figura 29). La banda proteica fue cortada del gel y enviada al servicio de proteómica del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) para su identificación mediante MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight*).

La comparación con las bases de datos indicó que la proteína con actividad glutenásica de *Ser. marcescens* CECT 846 es una metaloproteasa ya descrita en la literatura, la serrapeptasa.

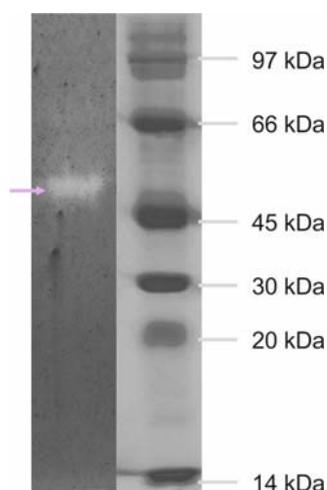


Figura 29. Banda de degradación de gliadina producida por el sobrenadante de *Ser. marcescens* CECT 846 obtenida mediante zimografía en gel de gliadina.

3.8.2. Identificación de las enzimas con actividad glutenásica de *S. maltophilia* CA18.5

En el caso de *S. maltophilia* CA18.5 se detectaron 2 bandas que se correspondían con dos 2 proteínas de ~45 y ~55 kDa (Figura 30). Ambas bandas proteicas fueron cortadas del gel y enviadas al servicio de proteómica del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) para su identificación mediante MALDI-TOF.

El análisis de las bandas de ~45 kDa y ~55 kDa de *S. maltophilia* CA18.5 indicó que se trataba de dos serín proteasas de la familia de la subtilisina, descritas con anterioridad por Windhorst *et al.*, (2002) y Ribitsch *et al.*, (2012) y denominadas StmPr1 y StmPr3 respectivamente. El tamaño real de estas proteasas es de 63 kDa StmPr1 y 61 kDa StmPr2. La diferencia entre el tamaño real y el observado podría deberse a que en nuestra muestra las proteínas estuviesen truncadas, o simplemente en su forma madura sin el péptido señal.

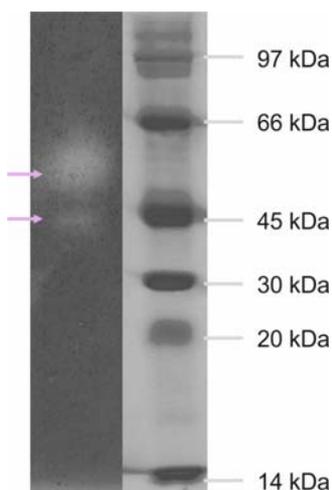


Figura 30. Bandas de degradación de gliadina producidas por el sobrenadante de *S. maltophilia* CA18.5 obtenidas mediante zimografía en gel de gliadina.

4. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTENÁSICA DE LA SERRAPEPTASA

La serrapeptasa, también conocida como serralisina o serratiopeptidasa, fue aislada y descrita por primera vez en 1970 por Miyata *et al.* Esta enzima lleva empleándose desde hace más de 40 años con fines terapéuticos en Europa y Japón. A pesar de que a lo largo de este tiempo varios investigadores la han caracterizado, su relación con la hidrólisis de gluten nunca ha sido descrita ni estudiada antes. Por esta razón, y en base a los resultados obtenidos de los ensayos preliminares llevados a cabo con *Serratia marcescens* CECT 846, decidimos seleccionar la serrapeptasa para estudiarla más en detalle.

4.1. Comparación de la serrapeptasa de *S. marcescens* CECT 846 con las serrapeptasas ya descritas

Empleando la técnica MALDI-TOF una vez que la proteína de interés se ha digerido con tripsina, se obtienen pequeños péptidos. Las secuencias de estos péptidos son comparadas con bases de datos, para observar su similitud con las proteínas que se encuentran en dicha base. Por lo tanto, mediante este método solo comparamos pequeñas fracciones de la secuencia. Con el fin de comprobar que la enzima producida por *S. marcescens* CECT 846 tiene al menos un 99% de similitud con aquellas serrapeptasas secuenciadas a partir de otras cepas, se procedió a la amplificación del gen.

La amplificación del gen de la serrapeptasa de *S. marcescens* CECT 846 se hizo mediante PCR empleando oligos específicos. Para diseñar los oligos, se alinearon las secuencias codificantes para la serrapeptasa de distintas cepas de *Serratia* presentes en la base de datos GenBank del NCBI. Los oligos se diseñaron a partir de regiones flanqueantes al gen de la serrapeptasa, conservadas entre las distintas cepas de *Serratia*.

Una vez amplificado el gen de la serrapeptasa de *S. marcescens* CECT 846, su secuencia fue depositada en GenBank con la referencia KR014114. Mediante análisis bioinformático pudimos concluir que la secuencia aminoacídica de la serrapeptasa producida por *S. marcescens* CECT 846 tiene una alta similitud (~99%) con varias de las serrapeptasas ya descritas (Figura 31). Por lo tanto, decidimos comprar la

serrapeptasa en Enzyme Technologies Ltd en lugar de purificarla a partir de la cepa de *S. marcescens* CECT 846.

De aquí en adelante el término serrapeptasa hará referencia a la enzima comercial, salvo que se especifique que se refiere a la serrapeptasa producida por *S. marcescens* CECT 846.

SM6metal	MQSTKKAIEI	TESSLAAATT	GYDAVDDLLH	YHERGNIGIQI	NGKDSFSNEQ	50
2170serr	MQSTKKAIEI	TESSLAAATT	GYDAVDDLLH	YHERGNIGIQI	NGKDSFSNEQ	
F1390met	MQSTKKAIEI	TESSLAAATT	GYDAVDDLLH	YHERGNIGIQI	NGKDSFSNEQ	
CECT846s	MQSTKKAIEI	TESSLAAATT	GYDAVDDLLH	YHERGNIGIQI	NGKDSFSNEQ	
	AGLFITRENQ	TWNGYKVFQ	PVKLTFSFPD	YKFSSTNVAG	DTGLSKFSAE	100
	AGLFITRENQ	TWNGYKVFQ	PVKLTFSFPD	YKFSSTNVAG	DTGLSKFSAE	
	AGLFITRENQ	TWNGYKVFQ	PVKLTFSFPD	YKFSSTNVAG	DTGLSKFSAE	
	AGLFITRENQ	TWNGYKVFQ	PVKLTFSFPD	YKFSSTNVAG	DTGLSKFSAE	
	QQQQAKLSLQ	SWADVANITF	TEVAAGQKAN	ITFGNYSQDR	PGHYDYGTQA	150
	QQQQAKLSLQ	SWADVANITF	TEVAAGQKAN	ITFGNYSQDR	PGHYDYGTQA	
	QQQQAKLSLQ	SWADVANITF	TEVAAGQKAN	ITFGNYSQDR	PGHYDYGTQA	
	QQQQAKLSLQ	SWADVANITF	TEVAAGQKAN	ITFGNYSQDR	PGHYDYGTQA	
	YAFLPNTIWQ	GQDLGGQTWY	NVNQSNVKHP	ATEDYGRQTF	THEIGHALGL	200
	YAFLPNTIWQ	GQDLGGQTWY	NVNQSNVKHP	ATEDYGRQTF	THEIGHALGL	
	YAFLPNTIWQ	GQDLGGQTWY	NVNQSNVKHP	ATEDYGRQTF	THEIGHALGL	
	YAFLPNTIWQ	GQDLGGQTWY	NVNQSNVKHP	ATEDYGRQTF	THEIGHALGL	
	SHPGDYNAGE	GNPTYNDVTY	AEDTRQFSLM	SYWSETNTGG	DNGGHYAAAP	250
	SHPGDYNAGE	GNPTYRDVTY	AEDTRQFSLM	SYWSETNTGG	DNGGHYAAAP	
	SHPGDYNAGE	GNPTYRDVTY	AEDTRQFSLM	SYWSETNTGG	DNGGHYAAAP	
	SHPGDYNAGE	GNPTYRDVTY	AEDTRQFSLM	SYWSETNTGG	DNGGHYAAAP	
	LLDDIAAIQH	LYGANPSTRT	GDTVYGFNSN	TGRDFLSTTS	NSQKVIFAAW	300
	LLDDIAAIQH	LYGANLSTRT	GDTVYGFNSN	TGRDFLSTTS	NSQKVIFAAW	
	LLDDIAAIQH	LYGANLSTRT	GDTVYGFNSN	TGRDFLSTTS	NSQKVIFAAW	
	LLDDIAAIQH	LYGANLSTRT	GDTVYGFNSN	TGRDFLSTTS	NSQKVIFAAW	
	DAGGNDTFDF	SGYTANQRIN	LNEKSFSDVG	GLKGNVSIAA	GVTIENAIGG	350
	DAGGNDTFDF	SGYTANQRIN	LNEKSFSDVG	GLKGNVSIAA	GVTIENAIGG	
	DAGGNDTFDF	SGYTANQRIN	LNEKSFSDVG	GLKGNVSIAA	GVTIENAIGG	
	DAGGNDTFDF	SGYTANQRIN	LNEKSFSDVG	GLKGNVSIAA	GVTIENAIGG	
	SGNDVIVGNA	ANNVLKGGAG	NDVLFGGGGA	DELWGGAGKD	IFVFSAAADS	400
	SGNDVIVGNA	ANNVLKGGAG	NDVLFGGGGA	DELWGGAGKD	IFVFSAAADS	
	SGNDVIVGNA	ANNVLKGGAG	NDVLFGGGGA	DELWGGAGKD	IFVFSAAADS	
	SGNDVIVGNA	ANNVLKGGAG	NDVLFGGGGA	DELWGGAGKD	IFVFSAAADS	
	APGASDWIRD	FQKGIDKIDL	SFFNKEANSS	DFIHFVDHFS	GTAGEALLSY	450
	APGASDWIRD	FQKGIDKIDL	SFFNKEAQSS	DFIHFVDHFS	GTAGEALLSY	
	APGASDWIRD	FQKGIDKIDL	SFFNKEAQSS	DFIHFVDHFS	GTAGEALLSY	
	APGASDWIRD	FQKGIDKIDL	SFFNKEAQSS	DFIHFVDHFS	GTAGEALLSY	
	NASSNVDLS	VNIGGHQAPD	FLVKIVGQVD	VATDFIV*		488
	NASSNVDLS	VNIGGHQAPD	FLVKIVGQVD	VATDFIV*		
	NASSNVDLS	VNIGGHQAPD	FLVKIVGQVD	VATDFIV*		
	NASSNVDLS	VNIGGHQAPD	FLVKIVGQVD	VATDFIV*		

Figura 31. Alineamiento aminoacídico de la serrapeptasa de *S. marcescens* CECT 846 con la metaloproteasa de *S. marcescens* SM6 (gi|47238|X55521.1), serralisina de *S. marcescens* 2170 (gi|558610979|AB873002.1), y metaloproteasa de *Serratia* sp. F1390 (gi|541129133|KF372856.1). Los aminoácidos que difieren entre cepas se encuentran marcados en rojo.

4.2. Estudio de inhibición de la actividad glutenásica de *S. marcescens* CECT 846 por EDTA

Con el fin de comprobar que la actividad glutenásica de *S. marcescens* CECT 846 era debida a la serrapeptasa, se comprobó el efecto del EDTA, un inhibidor de metaloproteasas, tanto sobre la enzima comercial como sobre el sobrenadante de *S. marcescens* CECT 846. Para ello se prepararon placas de MCG-1 EDTA 5 mM, y se comprobó mediante bioensayo si el EDTA inhibía la formación del halo de degradación del gluten alrededor del pocillo sobre el que se añadió la muestra: 10 mg/mL de serrapeptasa en NaCl 0,9% o el sobrenadante obtenido tras crecer *S. marcescens* CECT 846 en MCG-1 durante 24 h.

Como era de esperar, en ambos casos la actividad glutenásica se vio inhibida por completo en presencia de EDTA (Figura 32).

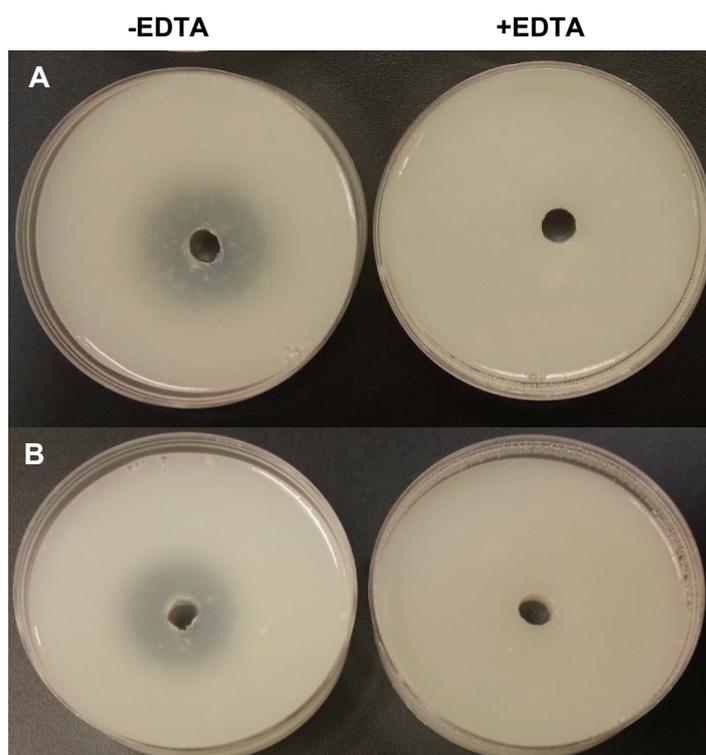


Figura 32. Ensayo de inhibición por EDTA de las actividades glutenásicas de (A) serrapeptasa; (B) *S. marcescens* CECT 846.

4.3. Estudio de la actividad glutenásica de la serrapeptasa en función de la temperatura y del pH

Los posibles campos de aplicación de la enzima van a depender en gran medida de las condiciones de pH y temperatura a las que sea activa. Por ejemplo, si se fuese a emplear para consumo humano y quisiésemos que actuase a nivel duodenal la enzima necesitaría ser activa a 37 °C y a pH~6. Previamente hemos caracterizado las condiciones óptimas de actividad en *S. marcescens* CECT 846, pero las interacciones que tienen lugar en el medio extracelular pueden ser complejas, y la enzima en ese ambiente puede estar mostrando un comportamiento distinto al que mostraría en su estado puro. Para estudiar las condiciones óptimas de pH y temperatura de la serrapeptasa, se hizo bioensayo en placas de MCG-1, tamponado a pHs entre 2 y 12 e incubado a 37 °C o tamponado a pH 6,5 e incubado a temperaturas entre 10 °C y 60 °C. La concentración de serrapeptasa que se usó fue de 0,1 mg/mL en NaCl 0,9%.

Los resultados mostraron que el rango de temperatura a la cual la serrapeptasa es activa va desde los 10 °C a los 40 °C. Como era de esperar, la temperatura óptima de la serrapeptasa comercial fue la misma que la mostrada por la actividad glutenásica de *S. marcescens* CECT 846, 40 °C. A temperaturas por encima de los 40 °C, la enzima perdió toda su actividad (Figura 33 A).

Respecto al pH, la serrapeptasa se mantiene activa entre pH 5 y 12 con un fuerte descenso de la actividad a pH 4. La actividad glutenásica está completamente inhibida por pH menores de 4. La proteasa mostró máxima actividad a pH 8 (Figura 33 B).

Las únicas diferencias encontradas entre la actividad glutenásica de *S. marcescens* CECT 846 y la actividad de la serrapeptasa comercial, fueron que mientras que a 50 °C *S. marcescens* CECT 846 es ligeramente activa, la serrapeptasa comercial pierde toda su actividad. Respecto al pH, ocurre todo lo contrario; en este caso es la serrapeptasa comercial la que muestra un rango mayor (de pH 4 a 12) mientras que *S. marcescens* CECT 846 a pH 4 se muestra inactiva.

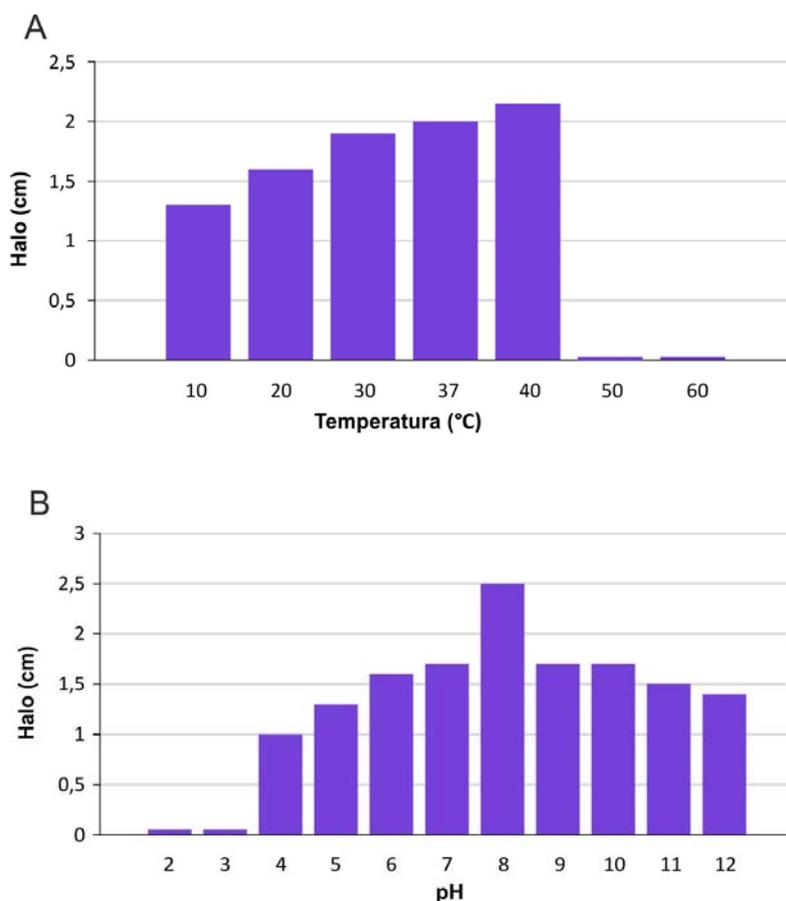


Figura 33. Rango de actividad de la serrapeptasa determinado mediante bioensayo en MCG-1 a distintas temperaturas (A) y pH (B).

4.4. Estudio de la estabilidad de la serrapeptasa a distintas temperaturas y pHs

A la hora de caracterizar una enzima es importante diferenciar entre actividad y estabilidad. Una enzima puede ser activa a una temperatura o pH y sin embargo podría no ser estable si se mantiene un cierto tiempo bajo esas condiciones. Igualmente, puede ocurrir que una enzima no sea activa a un determinado pH o temperatura, pero si sea estable. En este caso, cuando la enzima vuelva a estar en sus condiciones óptimas podría reactivarse y llevar a cabo su función.

El ensayo de la estabilidad se llevó a cabo mediante un ensayo de digestión de caseína descrito por Salamone y Wodzinski (1997). Previamente se hizo una recta patrón empleando distintas concentraciones de serrapeptasa. Se decidió usar una concentración final de serrapeptasa de 5 µg/mL.

El ensayo reveló que la serrapeptasa es estable cuando se incubaba 1 h a temperaturas entre 10 y 40 °C. Cuando el periodo de incubación transcurre a 50 °C y a 60 °C la actividad enzimática se pierde por completo (Figura 34 A). Respecto al pH, la

serrapeptasa es estable entre pH 5 y 9, con un acusado descenso de la actividad cuando se incubaba 1 h a pH 4 y 3. La enzima perdió toda su actividad cuando se incubó 1 h a pH 2 y a pH superiores a 9. Los pHs a los que muestra una mayor estabilidad fueron pH 7 y 8 (Figura 34 B).

Como se puede observar, el rango de actividad a distintas temperaturas coincide con el de estabilidad. Por el contrario, cuando se observa el pH, la actividad ocurre entre pH 4 y 12, y sin embargo el rango de estabilidad de la enzima es menor; solo es estable entre pH 5 y 9. Aunque es posible que a una condición dada la enzima sea activa pero no estable, no debería ser lo más común, sobre todo si se tiene en cuenta que en el ensayo de actividad, el tiempo necesario para que la enzima difunda y produzca un halo de degradación de gluten es superior al tiempo que se incubó la enzima para el ensayo de estabilidad. Por lo tanto, antes de que la serrapeptasa ejerciese su acción, habría tenido tiempo suficiente para ser inactivada. Una posible explicación sería que se han empleado métodos de ensayo distintos para determinar la actividad y la estabilidad. Quizás al ensayar la actividad mediante bioensayo, la matriz que compone el medio sólido proteja de alguna manera frente a la degradación enzimática.

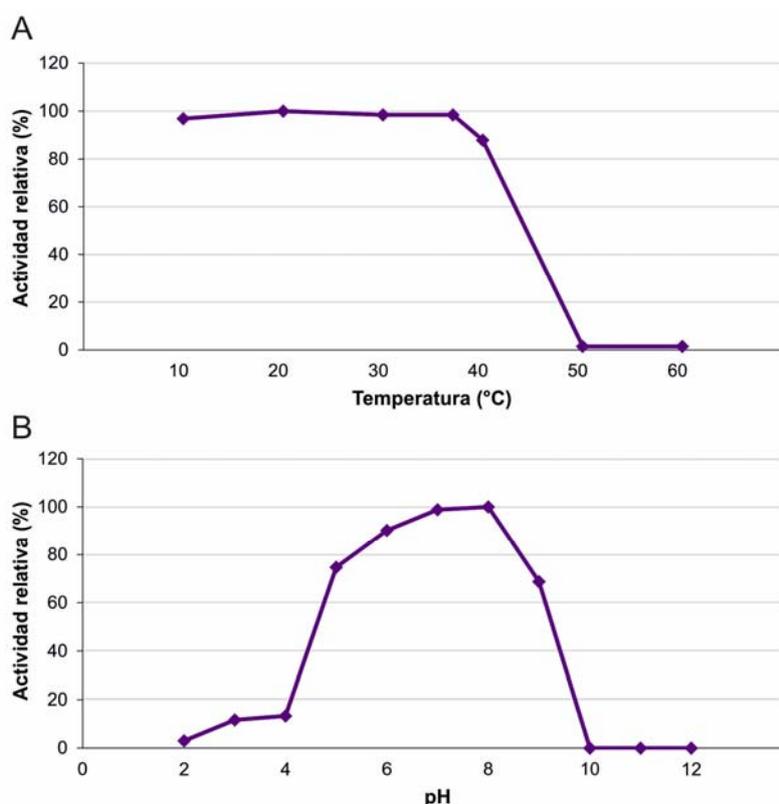


Figura 34. Ensayo caseinolítico que muestra la estabilidad de la serrapeptasa: (A) incubada a distintas temperaturas; (B) incubada a distintos pHs.

4.5. Determinación de las actividades PEP y DPPIV

Anteriormente se había visto que *S. marcescens* CECT 846 tiene actividad PEP (apartado 3.3.) Aunque parece probable que la degradación de péptidos con residuos de prolina fuese fruto de la actividad de la serrapeptasa, es necesario comprobarlo. De la misma forma se quiso comprobar que al igual que *S. marcescens* CECT 846 no tenía actividad DPPIV, la enzima pura tampoco la tenía. Para hacer el ensayo se partió de una concentración inicial de serrapeptasa de 10 mg/mL en NaCl 0,9%.

El ensayo con la enzima demostró que efectivamente la serrapeptasa no posee actividad DPPIV pero si tiene actividad PEP. La actividad PEP se cuantificó dando como resultado 1500 U/g de serrapeptasa.

4.6. Estudio de la hidrólisis del 33-mer en función del tiempo de incubación

Al igual que en el caso de *S. marcescens* CECT 846, se quiso comprobar si la serrapeptasa comercial presentaba actividad peptidolítica frente al 33-mer. El ensayo se realizó a distintos tiempos (0, 3, 6, 12 y 24 h). Con este fin, se prepararon varias reacciones de incubación de la serrapeptasa (200 U/mL) con 2,4 nmol de 33-mer. Las reacciones se pararon a los distintos tiempos y fueron guardadas a 4 °C para ser analizadas posteriormente todas juntas. La integridad del péptido se analizó mediante HPLC. Como muestra la Figura 35, el pico correspondiente al péptido 33-mer desaparece completamente en tan solo 3 h. El aumento del tiempo de incubación no parece afectar de forma significativa a una mayor hidrólisis. Por lo tanto, se puede concluir que 34 µg de serrapeptasa son suficientes para hidrolizar 2,4 nmol de 33-mer en un corto periodo de tiempo.

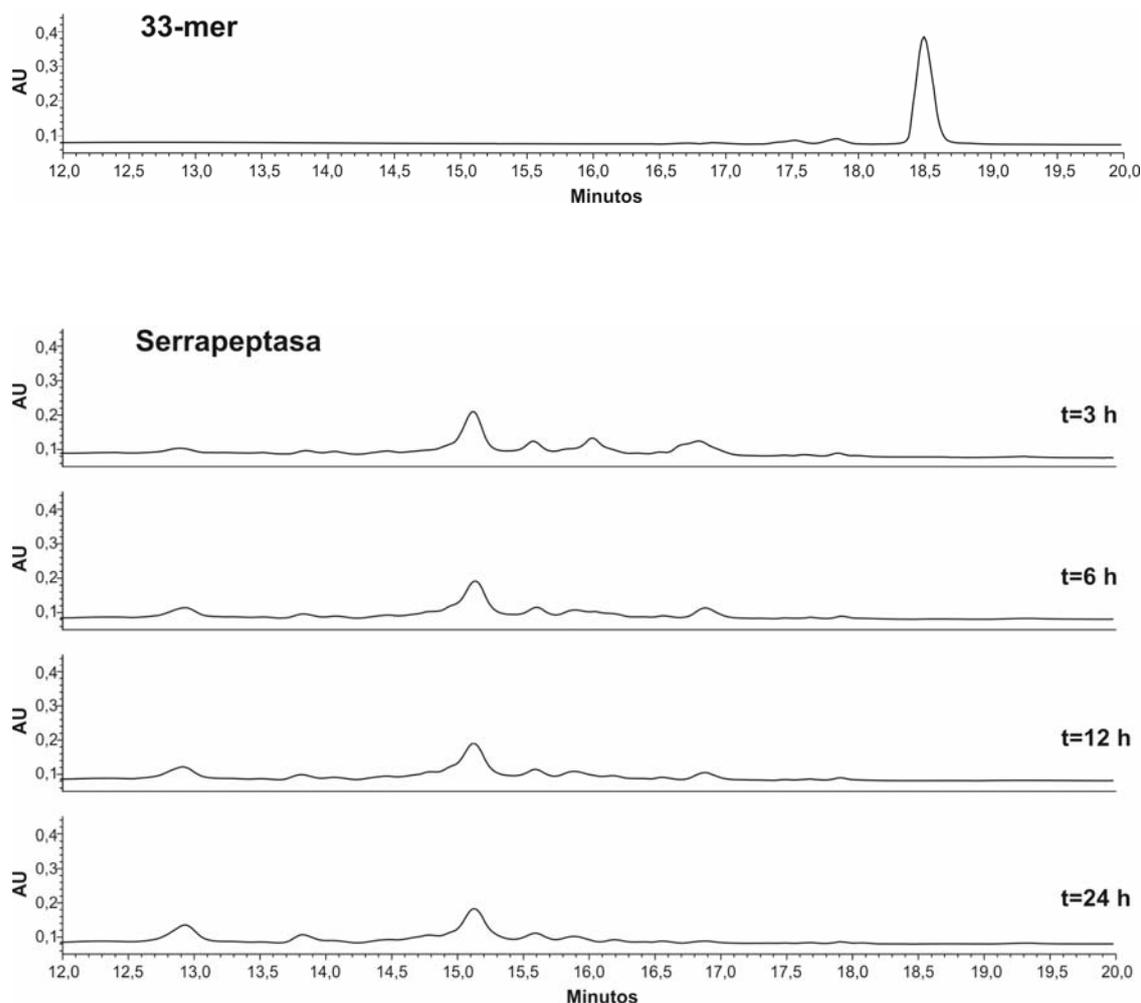


Figura 35. Perfil generado por la degradación del 33-mer tras su incubación durante distintos tiempos con la serrapeptasa.

4.7. Estudio de la actividad hidrolítica frente a los ATIs

En este apartado al igual que se hizo previamente con *S. marcescens* CECT 846, *S. maltophilia* CA18.5, *B. pumilus* CT56.6 y *P. aeruginosa* CT46.1, se pretende analizar si la serrapeptasa comercial además de hidrolizar el 33-mer es capaz de hidrolizar los ATIs que son frecuentemente co-purificados con el gluten y estimulan una respuesta inflamatoria en individuos celíacos.

Este experimento se pudo realizar gracias a la colaboración del Dr. Schuppan, que proporcionó tanto el material como el lugar y la experiencia necesaria para realizarlo.

Se incubó la serrapeptasa a una concentración final de 10 mg/mL en medio LB con 2 μ g ATIs/ μ L a 37 °C a 200 rpm. A tiempos 2, 4 y 16 h se tomaron muestras y fueron

analizadas mediante *Western Blott* usando anticuerpos específicos frente a las fracciones de ATIs más abundantes: CM3 y 0.19. Como control positivo se añadieron ATIs sin incubar con la serrapeptasa, y como control negativo se añadió una solución con la serrapeptasa sin ATIs.

Como se puede observar en la Figura 36, la serrapeptasa hidroliza de forma altamente eficiente la fracción CM3 de los ATIs. En tan solo 2 h, es capaz de hidrolizarla por completo dejando solo una pequeña cantidad residual. Sin embargo, en el caso de la fracción 0.19 solo se aprecia una pequeña reducción a las 16 h de incubación.

Por lo tanto, podemos concluir que la serrapeptasa es capaz de hidrolizar eficientemente tanto el 33-mer como la fracción CM3 de los ATIs, aunque no la 0.19. Para analizar si se reducen los efectos inmunotóxicos de los ATIs al incubarlos con la serrapeptasa, sería necesario realizar otra serie de experimentos adicionales.

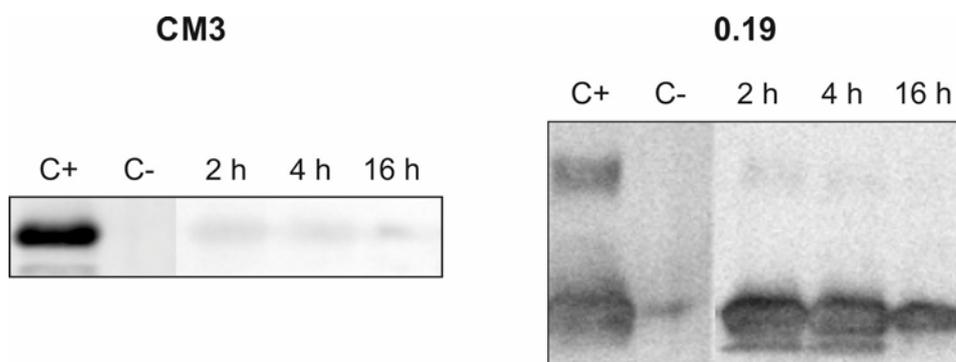


Figura 36. Análisis mediante *Western Blott* de la degradación a distintos tiempos de las fracciones de ATIs CM3 y 0.19 por la serrapeptasa. C+: control positivo. C-: control negativo.

V. DISCUSIÓN GENERAL

1. El intestino delgado humano está habitado por bacterias implicadas en el metabolismo del gluten

La EC es una enfermedad compleja desencadenada por la ingesta de gluten en individuos genéticamente susceptibles. Sin embargo, no todos los individuos que tienen susceptibilidad genética e ingieren esta proteína enferman, por lo que se sabe que debe haber otros factores implicados (Kagnoff, 2007). Uno de los más importantes que se postulan es el papel que pueda jugar la microbiota intestinal en el desarrollo de la enfermedad. Hasta ahora, son varios los grupos que han intentado encontrar diferencias en la microbiota GI entre individuos sanos, enfermos celiacos tratados, enfermos celiacos activos y en algunos casos familiares de celiacos. La mayor parte de estos estudios se han centrado en la microbiota fecal, mientras que solo unos pocos han analizado la microbiota del intestino delgado. Además, de todos los estudios enfocados al análisis de la microbiota en el intestino delgado, solo dos han sido realizados en adultos (Nistal *et al.*, 2012b; Wacklin *et al.*, 2013). A pesar de que se ha descrito la existencia de una disbiosis intestinal en algunos pacientes celiacos, las implicaciones patofisiológicas de las bacterias intestinales siguen siendo desconocidas, y hay que considerar que quizás la importancia no radique en la presencia de unas comunidades bacterianas u otras, sino en la funcionalidad de estas especies.

La parte superior del intestino delgado es comúnmente considerada un ambiente hostil para el crecimiento bacteriano debido a la presencia de sales biliares y al bajo pH entre otros factores. De hecho se estima que la densidad bacteriana en el duodeno es tan solo de 10^4 UFC/g de contenido (Booijink *et al.*, 2007). En cualquier caso, el intestino delgado aporta un ecosistema rico en nutrientes provenientes la dieta a la microbiota que lo habita. Es en este compartimento donde tiene lugar la mayor parte de la degradación de las proteínas ingeridas en la dieta, generándose péptidos y aminoácidos que podrían ser incorporados al metabolismo microbiano. Entre estos péptidos se encuentran aquellos que son recalcitrantes a la digestión por las enzimas digestivas humanas, como los péptidos del gluten (Hausch *et al.*, 2002).

Hay estudios previos que muestran que las bacterias intestinales se ven afectadas cuando el gluten es retirado de la dieta, lo que indica que este componente participa en la nutrición bacteriana (De Palma *et al.*, 2009; Sanz, 2010; Nistal *et al.*, 2012b). En esta Tesis Doctoral, se ha estudiado la microbiota duodenal implicada en el metabolismo del gluten de individuos S, CA, CT y F mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo. En ambos casos, se hizo previamente un cultivo de enriquecimiento a partir

de biopsias duodenales para incrementar el número de bacterias y favorecer el crecimiento de aquellas implicadas en el metabolismo del gluten.

Mediante PCR-DGGE se identificaron al menos 19 especies pertenecientes a 12 géneros bacterianos distintos. Todas las bacterias se incluyeron dentro de los filos *Firmicutes* (95%) y *Proteobacteria* (5%). Mediante técnicas dependientes de cultivo se aislaron e identificaron 114 cepas de bacterias duodenales que pertenecían a 32 especies. La mayor parte de las bacterias se clasificaron dentro del filo *Firmicutes* (88%), principalmente del género *Lactobacillus* (68%), pero también se identificaron bacterias de los filos *Actinobacteria* (8%), *Proteobacteria* (3%) y *Bacteroidetes* (1%). Esto es acorde a estudios previos que establecen que estos son los filos bacterianos principales en el tracto gastrointestinal humano (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2007; Sartor y Mazmanian, 2012).

En cualquier caso, como describen Hamer *et al.* (2012) en su revisión sobre el metabolismo de las bacterias del colon, la simple presencia de las bacterias o más específicamente de sus genes, no implica necesariamente que estos sean importantes. Para comprender mejor la funcionalidad de la microbiota intestinal humana, es necesario estudiar más en detalle sus funciones empleando para ello una diana apropiada. En esta Tesis Doctoral lo que se pretendía analizar es la implicación bacteriana en el metabolismo del gluten. Las proteínas que forman parte del gluten son parcialmente digeridas en el tracto GI generando péptidos de alto peso molecular capaces de desencadenar la EC. Aunque no se han visto diferencias entre pacientes celíacos y voluntarios sanos, si se ha puesto de manifiesto que los principales grupos bacterianos que habitan el tracto GI pueden estar participando en el metabolismo del gluten. De hecho, algunas de estas bacterias fueron capaces de hidrolizar el péptido inmunotóxico 33-mer. Entre las bacterias que hidrolizan el 33-mer encontramos representantes de los géneros *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.

A pesar de que las técnicas dependientes de cultivo no son las ideales para analizar diferencias entre comunidades microbianas, hay estudios que han descrito una disbiosis a nivel duodenal en pacientes enfermos celíacos, en la que están implicados algunos de los grupos bacterianos que hemos visto que participan en el metabolismo del gluten (Nadal *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2008; Collado *et al.*, 2009; Nistal *et al.*, 2012b; Sanchez *et al.*, 2013). Bernardo *et al.* (2009) mostraron mediante zimografía que los pacientes celíacos tenían un perfil de proteasas bacterianas capaces de hidrolizar gliadina que estaba ausente en sanos. Esto apoya la teoría de que no solo hay un

desequilibrio en las poblaciones bacterianas sino que la funcionalidad de estas poblaciones podría estar alterada, aunque hacen falta más estudios para desentramar el papel real de las bacterias en el metabolismo del gluten y su implicación en el desarrollo de la EC.

2. *Lactobacillus* es el género mayoritario identificado en el intestino delgado y algunas cepas poseen actividad peptidolítica frente al 33-mer

Lactobacillus fue el género más representativo en este estudio, y es uno de los grupos principales que se han ligado a la EC. Existen diferentes evidencias que apoyan la idea de que los lactobacilos podrían estar implicados en el metabolismo del gluten. Para empezar, hay estudios previos que demuestran que el género *Lactobacillus* se ve afectado cuando el gluten es retirado de la dieta en enfermos celíacos, y en voluntarios sanos (De Palma *et al.*, 2009; Sanz, 2010; Nistal *et al.*, 2012b). Además, este género bacteriano tiene la peculiaridad de que necesita un alto aporte aminoacídico, ya que no solo emplean los aminoácidos como una fuente de nitrógeno, sino que también los usan para su metabolismo energético. Por esta razón, los lactobacilos han desarrollado sistemas proteolíticos y peptidolíticos complejos. Estos sistemas incluyen proteasas extracelulares e intracelulares, así como proteasas ancladas a la membrana y proteínas de transporte de membrana (Kunji *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2010). Se ha descrito que en el caso de los lactobacilos del tracto GI humano, estas proteasas podrían estar implicadas en la digestión de proteínas que han sido parcialmente hidrolizadas (Pessione, 2012). Es interesante fijarse en que precisamente varios microorganismos de este grupo (*L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* y *L. vaginalis*) fueron capaces de hidrolizar el 33-mer completamente. Además, por los resultados obtenidos podemos concluir que la enzima responsable de dicha actividad al menos en el caso de *L. gasseri* es intracelular y se ve estimulada por la presencia de gluten en el medio. También se ha podido determinar que *L. gasseri* F39.4 degrada el 33-mer en aquellos momentos en los que muestra una alta actividad autolítica, por lo que existe una correlación entre la producción de autolisinas y la digestión de dicho péptido. Aunque posiblemente los demás lactobacilos tengan un comportamiento similar, sería necesario repetir los experimentos con cada una de las cepas para comprobarlo. Se podría concluir que la producción de enzimas con actividad peptidoglicano hidrolásica produce la liberación de las enzimas intracelulares de aquellas bacterias sobre las que actúan. En algunos casos como en *L. gasseri* F39.4, formando parte de este conjunto de enzimas intracelulares se encuentran enzimas con actividad peptidolítica frente al 33-mer y por lo tanto la hidrólisis de este péptido se ve afectada de forma directa por la

producción de peptidoglicano hidrolasas por los diversos lactobacilos. Esto nos da una idea de la complejidad que pueden alcanzar las interacciones entre los microorganismos y de cómo, una bacteria que quizás por sí misma no sería capaz de ejercer un efecto beneficioso específico en el hospedador, en presencia de otras bacterias sí podría ejercer este efecto. La evidencia de que los lactobacilos están implicados en el metabolismo del gluten se ve también apoyado por el hecho de que no es la primera vez que se describe a este género como el grupo bacteriano principal capaz de degradar el gluten en el tracto GI. Caminero *et al.* (2014b) aisló a partir de muestras de heces humanas *L. amylovorus* y *L. rhamnosus* con actividad peptidolítica sobre el 33-mer. Un estudio más reciente realizado por Duar *et al.* (2015) describe la presencia de varios lactobacilos (*L. johnsii*, *L. amylovorus*, *L. ruminis* y *L. salivarius*) con esta misma actividad peptidolítica en el intestino delgado de cerdos. En cualquier caso, esta es la primera vez que se describen lactobacilos capaces de hidrolizar el 33-mer en el intestino delgado humano.

Lactobacillus es uno de los géneros más estudiados para su uso como probiótico por varias razones como que suelen ser considerados microorganismos seguros para su consumo, y además están adaptados a vivir en las condiciones que hay en el intestino humano (Fijan, 2014; Pandey *et al.*, 2015). Por lo tanto, aquellos lactobacilos con actividad peptidolítica frente al 33-mer podrían ser administrados como probióticos, y empleados como un tratamiento adyuvante a la DSG para eliminar aquellas trazas de gluten que se consumen de forma inadvertida. Uno de los factores que recomienda tener en cuenta la FAO para el empleo de cualquier microorganismo como probiótico, es el estudio de su actividad mucilaginásica. Cuando realizamos esta prueba, observamos que sólo *L. gasseri* (y no todas las cepas) presentaban dicha actividad. En cualquier caso, *L. gasseri* es considerado un microorganismo QPS por la EFSA (*European Food Safety Authority*), y además existe un pequeño debate acerca de si la actividad mucilaginásica es un factor de virulencia o es una característica necesaria para el crecimiento de muchos de los microorganismos que habitan el tracto GI (Derrien *et al.*, 2004; Macfarlane *et al.*, 2005). Por lo tanto, no se descarta el posible uso como probiótico de ninguno de los lactobacilos aislados, aunque hacen falta más ensayos que evalúen la eficacia de sus enzimas hidrolíticas del 33-mer *in vivo*.

Además del uso como probiótico de los lactobacilos, hay otra serie de microorganismos duodenales y ambientales que hemos caracterizado por considerarlos de interés para diversas aplicaciones relacionadas con el campo de la celiarquía: *Bacillus pumilus* CT56.5, *Stenotrophomonas maltophilia* CA18.5, *Pseudomonas aeruginosa*

CT46.1 y *Serratia marcescens* CECT 846. El interés de estos microorganismos se discute en detalle en el apartado siguiente.

3. Las bacterias *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 así como la enzima serrapeptasa reducen de forma efectiva la toxicidad del gluten

Actualmente el único tratamiento posible para los enfermos celíacos es la total exclusión del gluten de la dieta. Sin embargo, se sabe que llevar a cabo una dieta completamente libre de gluten es muy difícil, debido a la presencia de trazas de gluten (Chand y Mihás, 2006; Siegel *et al.*, 2006). Estas trazas se pueden encontrar tanto en la vajilla empleada para comer, como sobre superficies o incluso en alimentos etiquetados como libres de gluten, debido a la contaminación cruzada de los mismos (Francavilla *et al.*, 2014). La ingesta inadvertida de estas trazas de gluten puede causar un daño intestinal (Gibert *et al.*, 2013), llegando en algunos casos incluso a impedir la mejoría de los enfermos celíacos a pesar de estar llevando a cabo una DSG. Por lo tanto, se necesitan nuevos tratamientos alternativos para evitar el daño intestinal en pacientes celíacos que están bajo una DSG, pero inevitablemente consumiendo trazas de esta proteína. Una de las alternativas propuestas es el uso de proteasas, siendo las más estudiadas las prolilendopeptidasas (PEPs).

Las PEPs son una familia de serín proteasas capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos de prolina (Shan *et al.*, 2004), y por lo tanto capaces de hidrolizar péptidos del gluten ricos en prolina hasta fragmentos pequeños que no estimulan la respuesta inflamatoria característica de la EC (Sollid y Khosla, 2005). Hasta la fecha se han realizado varios estudios clínicos tanto con PEPs como con otras proteasas purificadas de distintos organismos, pero ninguno de ellos ha sido aceptado aún como un tratamiento definitivo (Tack *et al.*, 2013; Lahdeaho *et al.*, 2014). Además, se ha comprobado que en determinados casos la combinación de varias de estas enzimas puede mejorar su eficacia. Por lo tanto, sigue siendo necesaria la búsqueda y estudio de nuevas enzimas para eliminar trazas de gluten.

En este trabajo, hemos identificado microorganismos que presentan un gran potencial para la eliminación de trazas de gluten a partir de dos ecosistemas distintos. Por un lado hemos aislado y caracterizado *Bacillus pumilus* CT56.5, *Stenotrophomonas maltophilia* CA18.5 y *Pseudomonas aeruginosa* CT46.1 de biopsias duodenales. Por el otro, hemos descrito y caracterizado la enzima serrapeptasa que fue identificada a partir de *Serratia marcescens* CECT 846; una bacteria que fue aislada originalmente del agua

de un estanque de la República Checa. Estos microorganismos no solo presentan actividad peptidolítica frente al 33-mer, sino que producen enzimas extracelulares con actividad glutenásica.

Mediante el cultivo de biopsias se observó que tanto *B. pumilus* CT56.5 como *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1 producían enzimas extracelulares que degradaban el gluten. El sobrenadante del cultivo de estos microorganismos se empleó para caracterizar de forma preliminar el potencial que presentan sus enzimas con actividad glutenásica. En todos los casos los rangos de actividad a distintas temperaturas fueron muy amplios, situándose entre los 10 y 60 °C. Respecto al rango de pH, las enzimas producidas por los tres microorganismos fueron capaces de hidrolizar el gluten desde pHs ligeramente ácidos (pH 6 *B. pumilus* CT56.5 y pH 5 *S. maltophilia* CA18.5 y *P. aeruginosa* CT46.1) hasta pH 12, que fue el mayor pH ensayado. En todos los casos las enzimas mostraron actividad óptima a pHs neutro-alcalinos, con unos máximos de actividad a pH 8 *S. maltophilia* CA18.5 y pH 7 *P. aeruginosa* CT46.1. *B. pumilus* CT56.5 mostró máxima actividad en todo el rango desde pH 7 hasta pH 12. Además hemos comprobado que en 24 horas estos microorganismos son capaces de reducir la concentración del 33-mer en más de 1000 veces cuando este péptido se encuentra puro y también son capaces de reducir los epítotos tóxicos de un cultivo de gluten en más de 500 veces. De forma complementaria se ha comprobado que excepto *B. pumilus* CT56.5, los demás microorganismos son capaces de hidrolizar en menor o mayor medida las fracciones 0.19 y/o CM3 de los ATIs. Los datos obtenidos indican que estos microorganismos o sus enzimas podrían ser empleados en diversos campos de la celiacía. *B. pumilus* es considerado un microorganismo QPS por la EFSA, por lo que tanto el uso del microorganismo en sí a modo de probiótico como de su enzima podría ser aceptado. Sin embargo, tanto *S. maltophilia* como *P. aeruginosa* son considerados patógenos oportunistas, lo que reduce las posibles aplicaciones al uso de la enzima una vez purificada. Aunque en un principio pueda generar rechazo el uso de enzimas de microorganismos potencialmente patógenos, no es la primera vez que se estudian este tipo de enzimas para consumo humano. De hecho, algunos de los ensayos clínicos que se han llevado a cabo hasta el momento en el campo de la celiacía incluyen la proteasa de *Sphingomonas capsulata*, un microorganismo potencialmente patógeno (Lahdeaho *et al.*, 2014). Además hay que tener en cuenta que el hecho de que un microorganismo sea patógeno, no quiere decir que sus enzimas sean dañinas.

En cualquier caso, los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo con los sobrenadantes de los microorganismos y no con las enzimas purificadas, por lo que los datos obtenidos de la caracterización de las actividades podrían sufrir ligeras variaciones empleando las enzimas puras. Además, también hay que contemplar la posibilidad de que la actividad glutenásica presente en cada una de las bacterias no se deba a una única enzima, como es el caso de *S. maltophilia* CA18.5 donde mediante zimografía se identificaron dos serín proteasas con actividad glutenásica: StmPr1 y StmPr3. Por lo tanto, aunque estos resultados son prometedores, una vez comprobado su potencial, es necesario purificar las enzimas y caracterizarlas. Esto es precisamente lo que se ha hecho con el otro microorganismo estudiado que no fue aislado de biopsia duodenal, *Serratia marcescens* CECT 846.

Los experimentos realizados con *S. marcescens* CECT 846 mostraron unos resultados muy similares a los descritos para los microorganismos aislados de biopsia duodenal. Mediante zimografía se identificó la enzima responsable de la actividad glutenásica, una metaloproteasa denominada comúnmente serrapeptasa, serratiopeptidasa o serralisina.

El amplio espectro de pH y temperatura a los que actúa la serrapeptasa, permitiría emplearla potencialmente en un amplio abanico de aplicaciones para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EC. Por una parte, el hecho de que la enzima sea alcalina y presente actividad entre 10 y 40 °C implica que posiblemente podría ser usada en la industria de detergentes con el fin de eliminar trazas de gluten. Estos detergentes podrían ser utilizados tanto por los enfermos celíacos, como por bares y restaurantes para asegurar la correcta eliminación de trazas de gluten que hayan quedado en utensilios de cocina, o en las superficies, así como por las compañías que producen alimentos libres de gluten y quieren evitar contaminación cruzada descontaminando las superficies, o la maquinaria. Se sabe que las proteasas bacterianas son habitualmente usadas en la industria de los detergentes desde 1960 (Saeki *et al.*, 2007). Por lo tanto, la serrapeptasa podría ser añadida a los detergentes para asegurar una correcta eliminación del gluten en aquellas superficies a tratar. En cualquier caso, son necesarios más estudios que evalúen tanto la estabilidad como la actividad de la serrapeptasa en el ambiente característico de los detergentes. Otro posible uso de la enzima sería en la industria alimentaria para producir alimentos y bebidas libres de gluten. En este caso podría emplearse no solo para eliminar el gluten, sino también para reducir las trazas que hayan podido quedar debido a una eliminación incompleta del gluten, o a la contaminación cruzada.

Por otro lado, la temperatura óptima de la serrapeptasa se encuentra cercana a la temperatura del cuerpo humano, lo que permitiría a la enzima estar completamente activa si se emplease en terapia oral como adyuvante en una DSG en pacientes celíacos. Además, el pH del intestino delgado varía entre pH 6,5 en la parte proximal del duodeno y 7,5 en el íleon terminal (Evans *et al.*, 1988; Nugent *et al.*, 2001), encontrándose dentro del rango de actividad de la serrapeptasa, y cerca del óptimo. Esto supone que una vez que la serrapeptasa llegase al intestino delgado de los pacientes celíacos, se encontraría con unas condiciones óptimas de pH y temperatura para hidrolizar las trazas de gluten hasta péptidos más pequeños, presumiblemente no tóxicos por lo que se puede deducir de los experimentos mediante ELISA. Aunque hemos comprobado que la serrapeptasa hidroliza el 33-mer, es necesario evaluar su especificidad frente a distintos péptidos del gluten.

Es importante tener en cuenta que a día de hoy la serrapeptasa se lleva usando desde hace 40 años en Japón y Europa para tratar dolor e inflamación en humanos (Bhagat *et al.*, 2013). Inicialmente se administraba por vía parenteral, pero luego esta fórmula fue reemplazada por comprimidos con cubierta entérica para poder ser administrados por vía oral (Bhagat *et al.*, 2013). A pesar de que la dosis no ha sido establecida (se han realizado ensayos clínicos con dosis entre 10-60 mg/día (Al-Khateeb y Nusair, 2008; Bhagat *et al.*, 2013), esta enzima se está empleando actualmente para tratar dolor e inflamación, por lo que parece ser segura para su consumo humano. Mediante el análisis por HPLC hemos comprobado que *in vitro*, 34 µg de serrapeptasa son capaces de hidrolizar 2,4 nmol de 33-mer, lo que significa que 10 mg de serrapeptasa serían capaces de hidrolizar 2,8 mg de 33-mer. Si hacemos una equivalencia entre el 33-mer y el gluten, podemos estimar que *in vitro*, 10 mg de serrapeptasa podrían digerir hasta 225 mg de gluten.

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un ensayo preliminar de identificación y caracterización de bacterias del intestino delgado humano implicadas en el metabolismo del gluten. Así mismo se ha identificado y caracterizado una bacteria ambiental: *S. marcescens* CECT 846. Cada una de estas bacterias o sus enzimas degradadoras de gluten podrían ser empleadas para diversas aplicaciones como ser administradas a modo de adyuvantes de una DSG, o destoxificar el gluten *ex vivo*, pero todas ellas con un mismo fin: mejorar la calidad de vida de los enfermos celíacos. Para establecer su potencial real, tanto las bacterias como las enzimas deberán ser caracterizadas en profundidad en estudios posteriores.

VI. CONCLUSIONES

1. El duodeno humano está habitado por bacterias implicadas en el metabolismo del gluten.
2. La microbiota duodenal implicada en el metabolismo del gluten está dominada por los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*.
3. La presencia de bacterias duodenales que participan en el metabolismo del gluten es dependiente del individuo y no del diagnóstico.
4. Algunas bacterias duodenales presentan actividad peptidolítica frente al 33-mer.
5. Existe una relación directa entre la producción de autolisinas de *L. gasseri* F39.4 y la degradación del péptido 33-mer.
6. *B. pumilus* CT56.5, *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *Ser. marcescens* CECT 846 producen enzimas extracelulares capaces de reducir la toxicidad del 33-mer de manera altamente eficiente.
7. *S. maltophilia* CA18.5, *P. aeruginosa* CT46.1 y *Ser. marcescens* CECT 846 son capaces de reducir algunas fracciones tóxicas de los ATIs.
8. La serrapeptasa muestra características de actividad y estabilidad que hacen que esta enzima sea una buena candidata para eliminar trazas de gluten.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I y Heller RF (2006) Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child*. **91**: 39-43.
- Alaedini A y Green PH (2005) Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med*. **142**: 289-298.
- Ali FR y Larche M (2005) Peptide-based immunotherapy: a novel strategy for allergic disease. *Expert Rev Vaccines*. **4**: 881-889.
- Al-Khateeb TH y Nusair Y (2008) Effect of the proteolytic enzyme serrapeptase on swelling, pain and trismus after surgical extraction of mandibular third molars. *Int J Oral Maxillofac Surg*. **37**: 264-268.
- Bai J, Fried M, Corazza G, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, Greco L, Cohen H, Ciacci C, Fasano A, González A, Krabshuis J y LeMair A (2012) Celiac disease. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*.
- Bardella MT, Fredella C, Saladino V, Trovato C, Cesana BM, Quatrini M y Prampolini L (2005) Gluten intolerance: gender- and age-related differences in symptoms. *Scand J Gastroenterol*. **40**: 15-19.
- Barone MV, Nanayakkara M, Paoletta G, Maglio M, Vitale V, Troiano R, Ribecco MT, Lania G, Zanzi D, Santagata S, Auricchio R, Troncone R y Auricchio S (2010) Gliadin peptide P31-43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation. *PLoS One*. **5**: e12246.
- Bernardo D (2008) Interacciones innato-adaptativas en el sistema inmune y su relación con la patogenia de la enfermedad celiaca. Universidad de Valladolid.
- Bernardo D, Garrote JA, Nadal I, Leon AJ, Calvo C, Fernandez-Salazar L, Blanco-Quiros A, Sanz Y y Arranz E (2009) Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa. *Gut*. **58**: 886-887.
- Bhagat S, Agarwal M y Roy V (2013) Serratiopeptidase: a systematic review of the existing evidence. *Int J Surg*. **11**: 209-217.
- Biesiekierski JR y Iven J (2015) Non-coeliac gluten sensitivity: piecing the puzzle together. *United European Gastroenterol J*. **3**: 160-165.
- Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ y Relman DA (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 732-737.
- Blaut M y Clavel T (2007) Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr*. **137**: 751-755.
- Booijink CC, Zoetendal EG, Kleerebezem M y de Vos WM (2007) Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol*. **2**: 285-295.
- Brandtzaeg P (2006) The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett*. **105**: 127-139.
- Brown GJ, Daveson J, Marjason JK, Ffrench RA, Smith D, Sullivan M, Tye-Din JA y Anderson RP (2011) A Phase I Study to Determine Safety, Tolerability and Bioactivity of Nexvax2®

in HLA DQ2+ Volunteers With Celiac Disease Following a Long-Term, Strict Gluten-Free Diet. *Gastroenterology*. **140**: 437-438.

Bullock NR, Booth JC y Gibson GR (2004) Comparative composition of bacteria in the human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol*. **5**: 59-64.

Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P y Francis D (2000) Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology*. **100**: 119-130.

Camarca A, Del Mastro A y Gianfrani C (2012) Repertoire of gluten peptides active in celiac disease patients: perspectives for translational therapeutic applications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. **12**: 207-219.

Caminero A, Herran AR, Nistal E, Perez-Andres J, Vaquero L, Vivas S, Ruiz de Morales JM, Albillos SM y Casqueiro J (2014a) Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiol Ecol*. **88**: 309-319.

Caminero A, Nistal E, Arias L, Vivas S, Comino I, Real A, Sousa C, de Morales JM, Ferrero MA, Rodriguez-Aparicio LB y Casqueiro J (2012) A gluten metabolism study in healthy individuals shows the presence of faecal glutenase activity. *Eur J Nutr*. **51**: 293-299.

Caminero A, Nistal E, Herrán AR, Pérez-Andrés J, Vaquero L, Vivas S, Ruíz de Morales JM y Casqueiro J (2014b) Chapter 13 - Gluten Metabolism in Humans: Involvement of the Gut Microbiota. Wheat and Rice in Disease Prevention and Health. pp. 157-170. *Academic Press, San Diego*.

Caputo I, Lepretti M, Martucciello S y Esposito C (2010) Enzymatic strategies to detoxify gluten: implications for celiac disease. *Enzyme Res*. **2010**: 174354.

Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM y Owen LJ (2015) Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*. **26**: 26191.

Chand N y Mihas AA (2006) Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol*. **40**: 3-14.

Chen L, Li P, Wang J, Li X, Gao H, Yin Y, Hou Y y Wu G (2009) Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes. *Amino Acids*. **37**: 143-152.

Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A y Mazmanian SK (2010) Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*. **107**: 243-274.

Chung YC, Kim YS, Shadchehr A, Garrido A, Macgregor IL y Sleisenger MH (1979) Protein digestion and absorption in human small intestine. *Gastroenterology*. **76**: 1415-1421.

Ciccocioppo R, Di Sabatino A y Corazza GR (2005) The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. **140**: 408-416.

Cinova J, De Palma G, Stepankova R, Kofronova O, Kverka M, Sanz Y y Tuckova L (2011) Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *PLoS One*. **6**: e16169.

- Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M y Fasano A (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. **52**: 218-223.
- Cocolin L, Manzano M, Cantoni C y Comi G (2001) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol*. **67**: 5113-5121.
- Collado MC, Calabuig M y Sanz Y (2007) Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol*. **8**: 9-14.
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M y Sanz Y (2009) Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol*. **62**: 264-269.
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M y Sanz Y (2008) Imbalances in faecal and duodenal *Bifidobacterium* species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol*. **8**: 232-2180-8-232.
- Comino I, Real A, Vivas S, Siglez MA, Caminero A, Nistal E, Casqueiro J, Rodriguez-Herrera A, Cebolla A y Sousa C (2012) Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr*. **95**: 670-677.
- Comino I, Real A, de Lorenzo L, Cornell H, Lopez-Casado MA, Barro F, Lorite P, Torres MI, Cebolla A y Sousa C (2011) Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*. **60**: 915-922.
- Conway P (1995) Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. Microbial ecology of the human large intestine. *CRC Press, Florida*.
- Corouge M, Loridant S, Fradin C, Salleron J, Damiens S, Moragues MD, Souplet V, Jouault T, Robert R, Dubucquoi S, Sendid B, Colombel JF y Poulain D (2015) Humoral Immunity Links *Candida albicans* Infection and Celiac Disease. *PLoS One*. **10**: e0121776.
- Curtis T y Halford NG (2014) Food security: the challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Ann Appl Biol*. **164**: 354-372.
- D'Arienzo R, Maurano F, Luongo D, Mazzarella G, Stefanile R, Troncone R, Auricchio S, Ricca E, David C y Rossi M (2008) Adjuvant effect of *Lactobacillus casei* in a mouse model of gluten sensitivity. *Immunol Lett*. **119**: 78-83.
- Davila AM, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti PH, Sanz Y y Tome D (2013) Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res*. **68**: 95-107.
- De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, De Vincenzi M, Losito I y Gobbetti M (2006) VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *Biochim Biophys Acta*. **1762**: 80-93.
- De Kauwe AL, Chen Z, Anderson RP, Keech CL, Price JD, Wijburg O, Jackson DC, Ladhams J, Allison J y McCluskey J (2009) Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4+ T cells. *J Immunol*. **182**: 7440-7450.

- De Man JD, Rogosa M y Sharpe ME (1960) A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*. **23**: 130-135.
- De Palma G, Nadal I, Collado MC y Sanz Y (2009) Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr*. **102**: 1154-1160.
- De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M y Sanz Y (2010) Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol*. **10**: 63-2180-10-63.
- de Ritis G, Auricchio S, Jones HW, Lew EJ, Bernardin JE y Kasarda DD (1988) In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. **94**: 41-49.
- Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suarez A y Mayo B (2013) Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol*. **65**: 763-772.
- Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM y de Vos WM (2004) *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. **54**: 1469-1476.
- Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, Gagliardi F, Laghi L, Crecchio C, Guerzoni ME, Gobbetti M y Francavilla R (2011) Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol*. **11**: 219-2180-11-219.
- Di Sabatino A y Corazza GR (2009) Coeliac disease. *Lancet*. **373**: 1480-1493.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO y Schuppan D (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*. **3**: 797-801.
- DiGiacomo DV, Tennyson CA, Green PH y Demmer RT (2013) Prevalence of gluten-free diet adherence among individuals without celiac disease in the USA: results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2010. *Scand J Gastroenterol*. **48**: 921-925.
- Dobell C (1932) *Antony Van Leeuwenhoek and His Little Animals*. *Harcourt, Brace & Company, New York*.
- Dolcino M, Zanoni G, Bason C, Tinazzi E, Boccola E, Valletta E, Contreas G, Lunardi C y Puccetti A (2013) A subset of anti-rotavirus antibodies directed against the viral protein VP7 predicts the onset of celiac disease and induces typical features of the disease in the intestinal epithelial cell line T84. *Immunol Res*. **56**: 465-476.
- D'Ovidio R y Masci S (2004) The low-molecular weight glutenin subunits of wheat proteins. *Journal of Cereal Science*. **39**: 321-339.
- Duar RM, Clark KJ, Patil PB, Hernandez C, Bruning S, Burkey TE, Madayiputhiya N, Taylor SL y Walter J (2015) Identification and characterization of intestinal lactobacilli strains capable of degrading immunotoxic peptides present in gluten. *J Appl Microbiol*. **118**: 515-527.
- Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P y Sroka P (2015) Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *Eur J Nutr*. **54**: 325-341.

- Elgun S, Keskinoglu A y Kumbasar H (1999) Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activity. Decrease in depression. *Psychoneuroendocrinology*. **24**: 823-832.
- Ellis HJ y Ciclitira PJ (2008) Should coeliac sufferers be allowed their oats? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **20**: 492-493.
- Ellis HJ y Ciclitira PJ (2001) In vivo gluten challenge in celiac disease. *Can J Gastroenterol*. **15**: 243-247.
- Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ y Hardcastle JD (1988) Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*. **29**: 1035-1041.
- Evenepoel P, Geypens B, Rutgeerts P y Ghoois Y (1998) Study of protein assimilation, using stable isotope techniques. *Rev Med Univ Navarra*. **42**: 104-108.
- Farrell RJ y Kelly CP (2002) Celiac sprue. *N Engl J Med*. **346**: 180-188.
- Fasano A (2009) Surprises from celiac disease. *Sci Am*. **301**: 54-61.
- Ferguson A, Arranz E y O'Mahony S (1993) Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut*. **34**: 150-151.
- Fernandez-Feo M, Wei G, Blumenkranz G, Dewhirst FE, Schuppan D, Oppenheim FG y Helmerhorst EJ (2013) The cultivable human oral gluten-degrading microbiome and its potential implications in coeliac disease and gluten sensitivity. *Clin Microbiol Infect*. **19**: 386-394.
- Fijan S (2014) Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. **11**: 4745-4767.
- Forsberg G, Fahlgren A, Horstedt P, Hammarstrom S, Hernell O y Hammarstrom ML (2004) Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*. **99**: 894-904.
- Francavilla R, Cristofori F, Stella M, Borrelli G, Naspi G y Castellana S (2014) Treatment of celiac disease: from gluten-free diet to novel therapies. *Minerva Pediatr*. **66**: 501-516.
- Frazer AC, Fletcher RF, Ross CA, Shaw B, Sammons HG y Schneider R (1959) Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. *Lancet*. **2**: 252-255.
- Freeman HJ (2015) Celiac disease: a disorder emerging from antiquity, its evolving classification and risk, and potential new treatment paradigms. *Gut Liver*. **9**: 28-37.
- Ganapathy V, Gupta N y Martindale RG (2006) Chapter 65 - Protein Digestion and Absorption. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fourth Edition)*. pp. 1667-1692. *Academic Press, Burlington*.
- Gasbarrini A, Lauritano EC, Gabrielli M, Scarpellini E, Lupascu A, Ojetti V y Gasbarrini G (2007) Small intestinal bacterial overgrowth: diagnosis and treatment. *Dig Dis*. **25**: 237-240.
- Gasbarrini G y Mangiola F (2014) Wheat-related disorders: A broad spectrum of 'evolving' diseases. *United European Gastroenterol J*. **2**: 254-262.
- Gasbarrini G, Rickards O, Martinez-Labarga C, Pacciani E, Chilleri F, Laterza L, Marangi G, Scaldaferrri F y Gasbarrini A (2012) Origin of celiac disease: how old are predisposing haplotypes? *World J Gastroenterol*. **18**: 5300-5304.

- Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A y Khosla C (2007a) Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*. **133**: 472-480.
- Gass J, Vora H, Hofmann AF, Gray GM y Khosla C (2007b) Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids. *Gastroenterology*. **133**: 16-23.
- Gee S (1888) On the coeliac affection. *St Bartholomew's Hospital Report*. **24**: 17-20.
- Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vazquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, Gonzalez A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R y Xavier RJ (2014) The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. **15**: 382-392.
- Gibert A, Kruizinga AG, Neuhold S, Houben GF, Canela MA, Fasano A y Catassi C (2013) Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation. *Am J Clin Nutr*. **97**: 109-116.
- Gibson MK, Pesesky MW y Dantas G (2014) The yin and yang of bacterial resilience in the human gut microbiota. *J Mol Biol*. **426**: 3866-3876.
- Golfetto L, de Senna FD, Hermes J, Beserra BT, Franca Fda S y Martinello F (2014) Lower bifidobacteria counts in adult patients with celiac disease on a gluten-free diet. *Arq Gastroenterol*. **51**: 139-143.
- Goossens F, De Meester I, Vanhoof G y Scharpe S (1992) A sensitive method for the assay of serum prolyl endopeptidase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. **30**: 235-238.
- Gottlieb K, Dawson J, Hussain F y Murray JA (2015) Development of drugs for celiac disease: review of endpoints for Phase 2 and 3 trials. *Gastroenterol Rep (Oxf)*.
- Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP y Isolauri E (2000) Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. **83**: 186-192.
- Guarner F (2007) Role of intestinal flora in health and disease. *Nutr Hosp*. **22 (2)**: 14-19.
- Hagiage M (1993) Intestinal flora. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)*. **29**: 171-187.
- Hamer HM, De Preter V, Windey K y Verbeke K (2012) Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **302**: 1-9.
- Hamer RJ (2005) Coeliac Disease: background and biochemical aspects. *Biotechnol Adv*. **23**: 401-408.
- Hao W y Le Y (2004) Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in Molecular Biology*. **268**: 491-502.
- Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM y Khosla C (2002) Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **283**: 996-1003.

- Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, Fuchs D, Jahn HK, Freudenberg M, Loddenkemper C, Batra A, Lehr HA, Liesenfeld O, Blaut M, Gobel UB, Schumann RR y Bereswill S (2007) Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One*. **2**: 662.
- Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T y Brandtzaeg P (1996) Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology*. **89**: 494-501.
- Helmerhorst EJ, Zamakhchari M, Schuppan D y Oppenheim FG (2010) Discovery of a novel and rich source of gluten-degrading microbial enzymes in the oral cavity. *PLoS One*. **5**: e13264.
- Hemmeter J (1902) Diseases of the intestines: their special pathology, diagnosis and treatment. *P. Blakiston's Son & Co., Philadelphia*.
- Holmes DS y Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. **114**: 193-197.
- Hooper LV (2004) Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol*. **12**: 129-134.
- Hooper LV y Gordon JI (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. **292**: 1115-1118.
- Hooper LV, Midtvedt T y Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*. **22**: 283-307.
- Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W y Van de Wiele T (2011) Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev*. **69**: 245-258.
- Howdle PD, Corazza GR, Bullen AW y Losowsky MS (1981) Gluten sensitivity of small intestinal mucosa in vitro: quantitative assessment of histologic change. *Gastroenterology*. **80**: 442-450.
- Huibregtse IL, Marietta EV, Rashtak S, Koning F, Rottiers P, David CS, van Deventer SJ y Murray JA (2009) 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*. **183**: 2390-2396.
- Hungate RE (1969) Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Methods in Microbiology*. **3 (B)**: 117-132.
- Hurkman WJ y Tanaka CK (2007) Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **849**: 344-350.
- Iebba V, Santangelo F, Totino V, Nicoletti M, Gagliardi A, De Biase RV, Cucchiara S, Nencioni L, Conte MP y Schippa S (2013) Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One*. **8**: e61608.
- Janssen G, Christis C, Kooy-Winkelaar Y, Edens L, Smith D, van Veelen P y Koning F (2015) Ineffective degradation of immunogenic gluten epitopes by currently available digestive enzyme supplements. *PLoS One*. **10**: e0128065.

- Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, Zevallos V, Libermann TA, Dillon S, Freitag TL, Kelly CP y Schuppan D (2012) Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med.* **209**: 2395-2408.
- Kagnoff MF (2007) Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest.* **117**: 41-49.
- Kagnoff MF, Austin RK, Hubert JJ, Bernardin JE y Kasarda DD (1984) Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J Exp Med.* **160**: 1544-1557.
- Kelly CP, Green PH, Murray JA, Dimarino A, Colatrella A, Leffler DA, Alexander T, Arsenescu R, Leon F, Jiang JG, Arterburn LA, Paterson BM, Fedorak RN y Larazotide Acetate Celiac Disease Study Group (2013) Larazotide acetate in patients with coeliac disease undergoing a gluten challenge: a randomised placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* **37**: 252-262.
- Kilmartin C, Lynch S, Abuzakouk M, Wieser H y Feighery C (2003) Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following in vitro culture. *Gut.* **52**: 47-52.
- Kunji ER, Mierau I, Hagting A, Poolman B y Konings WN (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70**: 187-221.
- Kupper C (2005) Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology.* **128**: S121-7.
- Lahdeaho ML, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova OP, Karja-Lahdensuu T, Marcantonio A, Adelman DC y Maki M (2014) Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* **146**: 1649-1658.
- Lahteenoja H, Maki M, Viander M, Raiha I, Vilja P, Rantala I, Toivanen A y Syrjanen S (2000) Local challenge on oral mucosa with an alpha-gliadin related synthetic peptide in patients with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* **95**: 2880-2887.
- Laparra JM y Sanz Y (2010a) Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res.* **61**: 219-225.
- Laparra JM y Sanz Y (2010b) Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem.* **109**: 801-807.
- Laparra JM, Olivares M y Sanz Y (2013) Oral administration of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 ameliorates gliadin-induced alterations in liver iron mobilisation. *Br J Nutr.* **110**: 1828-1836.
- Laparra JM, Olivares M, Gallina O y Sanz Y (2012) *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PLoS One.* **7**: e30744.
- Larche M y Wraith DC (2005) Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med.* **11**: 69-76.
- Lievin-Le Moal V y Servin AL (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* **19**: 315-337.

- Liu M, Bayjanov JR, Renckens B, Nauta A y Siezen RJ (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*. **11**: 36-2164-11-36.
- Lorenzo Pisarello MJ, Vintini EO, Gonzalez SN, Pagani F y Medina MS (2015) Decrease in lactobacilli in the intestinal microbiota of celiac children with a gluten-free diet, and selection of potentially probiotic strains. *Can J Microbiol*. **61**: 32-37.
- Macfarlane GT, Cummings JH y Allison C (1986) Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol*. **132**: 1647-1656.
- Macfarlane S, Woodmansey EJ y Macfarlane GT (2005) Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol*. **71**: 7483-7492.
- Maiuri L, Troncone R, Mayer M, Coletta S, Picarelli A, De Vincenzi M, Pavone V y Auricchio S (1996) In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol*. **31**: 247-253.
- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Rispo A, Griffin M, Issekutz T, Quarantino S y Londei M (2005) Unexpected role of surface transglutaminase type II in celiac disease. *Gastroenterology*. **129**: 1400-1413.
- Makharia GK (2014) Current and emerging therapy for celiac disease. *Front Med (Lausanne)*. **1**: 6.
- Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J (1982) Molecular cloning: a Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N y Heyman M (2003) Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. **125**: 696-707.
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N y Heyman M (2005) Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. **129**: 786-796.
- McAllister CS y Kagnoff MF (2012) The immunopathogenesis of celiac disease reveals possible therapies beyond the gluten-free diet. *Semin Immunopathol*. **34**: 581-600.
- Medina M, De Palma G, Ribes-Koninckx C, Calabuig M y Sanz Y (2008) *Bifidobacterium* strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. *J Inflamm (Lond)*. **5**: 19-9255-5-19.
- Miles MJ, Carr HJ, McMaster TC, l'Anson KJ, Belton PS, Morris VJ, Field JM, Shewry PR y Tatham AS (1991) Scanning tunneling microscopy of a wheat seed storage protein reveals details of an unusual supersecondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 68-71.
- Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ y Shewry PR (2004) Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **44**: 379-407.

- Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L y Koning F (2008) Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. **57**: 25-32.
- Molberg O, McAdam S, Lundin KE, Kristiansen C, Arentz-Hansen H, Kett K y Sollid LM (2001) T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol*. **31**: 1317-1323.
- Mullis KB y Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. **155**: 335-350.
- Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M y Sanz Y (2007) Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol*. **56**: 1669-1674.
- Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T y Sakakibara S (1976) New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem*. **74**: 466-476.
- Neu J, Douglas-Escobar M y Lopez M (2007) Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr Clin Pract*. **22**: 174-182.
- Nieuwenhuizen WF, Pieters RH, Knippels LM, Jansen MC y Koppelman SJ (2003) Is *Candida albicans* a trigger in the onset of coeliac disease? *Lancet*. **361**: 2152-2154.
- Nistal E (2011) Estudio y comparación de la microbiota intestinal en individuos no celíacos, frente a pacientes diagnosticados de enfermedad celíaca. Universidad de León.
- Nistal E, Caminero A, Vivas S, Ruiz de Morales JM, Saenz de Miera LE, Rodríguez-Aparicio LB y Casqueiro J (2012a) Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. *Biochimie*. **94**: 1724-1729.
- Nistal E, Caminero A, Herran AR, Arias L, Vivas S, de Morales JM, Calleja S, de Miera LE, Arroyo P y Casqueiro J (2012b) Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis*. **18**: 649-656.
- Nistico L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzu G, Momigliano-Richiardi P, Greco L y Stazi MA (2006) Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*. **55**: 803-808.
- Noverr MC y Huffnagle GB (2004) Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol*. **12**: 562-568.
- Nugent SG, Kumar D, Rampton DS y Evans DF (2001) Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicilates and other drugs. *Gut*. **48**: 571-577.
- O'Hara AM y Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. **7**: 688-693.
- Olivares M, Laparra M y Sanz Y (2012) Oral administration of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates jejunal proteome in an in vivo gliadin-induced enteropathy animal model. *J Proteomics*. **77**: 310-320.

- Olivares M, Castillejo G, Varea V y Sanz Y (2014) Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *Br J Nutr.* **112**: 30-40.
- Østle HM, Vegarud G y Langsrud T (1995) Autolysis of *Lactococci*: Detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**: 3598-3603.
- Ou G, Hedberg M, Horstedt P, Baranov V, Forsberg G, Drobni M, Sandstrom O, Wai SN, Johansson I, Hammarstrom ML, Hernell O y Hammarstrom S (2009) Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol.* **104**: 3058-3067.
- Pagliari D, Urgesi R, Frosali S, Riccioni M, Newton E, Landolfi R., Pandolfi F. y Cianci R (2015) The interaction among microbiota, immunity and genetic and dietary factors is the *condicio sine qua non* celiac disease can develop. *Journal of Immunology Research.* **2015**: 1-10.
- Pandey V, Berwal V, Solanki N y Malik NS (2015) Probiotics: Healthy bugs and nourishing elements of diet. *J Int Soc Prev Community Dent.* **5**: 81-87.
- Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A y Meddings JB (2007) 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.* **26**: 757-766.
- Paulley JW (1954) Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J.* **2**: 1318-1321.
- Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F y Blaser MJ (2004) Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 4250-4255.
- Pessione E (2012) Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol.* **2**: 86.
- Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray JA, David CS, Drasarova H, Tuckova L, Leroux JC y Verdu EF (2012) The copolymer P(HEMA-co-SS) binds gluten and reduces immune response in gluten-sensitized mice and human tissues. *Gastroenterology.* **142**: 316-25.e1-12.
- Plenge RM (2010) Unlocking the pathogenesis of celiac disease. *Nat Genet.* **42**: 281-282.
- Plot L y Amital H (2009) Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev.* **8**: 316-319.
- Pruteanu M, Hyland NP, Clarke DJ, Kiely B y Shanahan F (2011) Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* **17**: 1189-1200.
- Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C y Sollid LM (2004) Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol.* **173**: 1757-1762.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen

- K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD y Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. **464**: 59-65.
- Rajilic-Stojanovic M y de Vos WM (2014) The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev*. **38**: 996-1047.
- Rajilic-Stojanovic M, Smidt H y de Vos WM (2007) Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol*. **9**: 2125-2136.
- Rastall RA (2004) Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr*. **134**: 2022-2026.
- Real A, Comino I, de Lorenzo L, Merchan F, Gil-Humanes J, Gimenez MJ, Lopez-Casado MA, Torres MI, Cebolla A, Sousa C, Barro F y Piston F (2012) Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One*. **7**: e48365.
- Ribitsch D, Heumann S, Karl W, Gerlach J, Leber R, Birner-Gruenberger R, Gruber K, Eiteljoerg I, Remler P, Siegert P, Lange J, Maurer KH, Berg G, Guebitz GM y Schwab H (2012) Extracellular serine proteases from *Stenotrophomonas maltophilia*: Screening, isolation and heterologous expression in *E. coli*. *J Biotechnol*. **157**: 140-147.
- Richman E (2012) The safety of oats in the dietary treatment of coeliac disease. *Proc Nutr Soc*. **71**: 534-537.
- Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C y Gobbetti M (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol*. **73**: 4499-4507.
- Roberts NB (2006) Review article: human pepsins - their multiplicity, function and role in reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*. **24 (2)**: 2-9.
- Robic S, Linscott KB, Aseem M, Humphreys EA y McCartha SR (2011) Bile acids as modulators of enzyme activity and stability. *Protein J*. **30**: 539-545.
- Saeki K, Ozaki K, Kobayashi T y Ito S (2007) Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J Biosci Bioeng*. **103**: 501-508.
- Sakata H, Yoshioka H y Fujita K (1985) Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. **144**: 186-190.
- Salamone PR y Wodzinski RJ (1997) Production, purification and characterization of a 50-kDa extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **48**: 317-324.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) Molecular cloning: a Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press, New York*.
- San Mauro Martin I, Garicano Vilar E, Collado Yurrutia L y Ciudad Cabanas MJ (2014) Is gluten the great etiopathogenic agent of disease in the XXI century? *Nutr Hosp*. **30**: 1203-1210.
- Sanchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Fernandez-Murga ML y Sanz Y (2013) Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Appl Environ Microbiol*. **79**: 5472-5479.

- Sanchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M y Sanz Y (2010) Intestinal Bacteroides species associated with coeliac disease. *J Clin Pathol.* **63**: 1105-1111.
- Sanz Y (2010) Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes.* **1**: 135-137.
- Sanz Y, Sanchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S y Dellaglio F (2007) Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **51**: 562-568.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C y Fasano A (2012) Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* **10**: 13-7015-10-13.
- Sartor R y Mazmanian S (2012) Intestinal microbes in inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology Supplements.* **1**: 15-21.
- Savvateeva LV, Gorokhovets NV, Makarov VA, Serebryakova MV, Solovyev AG, Morozov SY, Reddy VP, Zernii EY, Zamyatnin AA, Jr y Aliev G (2015) Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain-alpha: Feasibility for enzymatic therapy assays. *Int J Biochem Cell Biol.* **62**: 115-124.
- Schaart MW y Mearin ML (2014) Early nutrition: prevention of celiac disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **59** (1): 18-20.
- Schipa S, Iebba V, Barbato M, Di Nardo G, Totino V, Checchi MP, Longhi C, Maiella G, Cucchiara S y Conte MP (2010) A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. *BMC Microbiol.* **10**: 175-2180-10-175.
- Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M y Schulzke JD (2008) Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* **57**: 747-754.
- Schuppan D, Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U y Riecken EO (1998) Identification of the autoantigen of celiac disease. *Ann N Y Acad Sci.* **859**: 121-126.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R y Dore J (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* **52**: 237-242.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM y Khosla C (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (New York, N.Y.).* **297**: 2275-2279.
- Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM y Khosla C (2004) Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J.* **383**: 311-318.
- Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg O, Gray GM, Sollid LM y Khosla C (2005) Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res.* **4**: 1732-1741.
- Shewry PR (2009) Wheat. *J Exp Bot.* **60**: 1537-1553.

- Shewry PR y Halford NG (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot.* **53**: 947-958.
- Shewry PR y Tatham AS (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem J.* **267**: 1-12.
- Shewry P, Arthur S, Tatham J, Kreis M y Miflin B (1986) The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science.* **4**: 97-106.
- Shroff KE, Meslin K y Cebra JJ (1995) Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun.* **63**: 3904-3913.
- Shulman ST, Friedmann HC y Sims RH (2007) Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis.* **45**: 1025-1029.
- Siegel M, Xia J y Khosla C (2007) Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. *Bioorg Med Chem.* **15**: 6253-6261.
- Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, Stuge TB, Gray GM, Lee PP y Khosla C (2006) Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol.* **13**: 649-658.
- Silano M, Vincentini O, Iapello A, Mancini E y De Vincenzi M (2008) Antagonist peptides of the gliadin T-cell stimulatory sequences: a therapeutic strategy for celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* **42 (3-2)**: 191-192.
- Singer C (1942) A great country doctor. Francis Adams of Banchory 1796-1861. *Bulletin of the History of Medicine.* **12**: 1-17.
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P y Dore J (2009) Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* **15**: 1183-1189.
- Sollid LM (2002) Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* **2**: 647-655.
- Sollid LM y Lie BA (2005) Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **3**: 843-851.
- Sollid LM y Khosla C (2005) Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* **2**: 140-147.
- Stappenbeck TS, Hooper LV y Gordon JI (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 15451-15455.
- Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS y Rewers M (2006) *Rotavirus* infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol.* **101**: 2333-2340.
- Stern M, Ciclitira PJ, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez E, Mothes T, Troncone R y Wieser H (2001) Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **13**: 741-747.

- Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Kontakou M, Ciclitira PJ, Lundin KEA y Gjertsen HA (1994) Wheat peptide challenge in coeliac disease. *The Lancet*. **343**: 758-761.
- Tack GJ, van de Water JM, Bruins MJ, Kooy-Winkelaar EM, van Bergen J, Bonnet P, Vreugdenhil AC, Korponay-Szabo I, Edens L, von Blomberg BM, Schreurs MW, Mulder CJ y Koning F (2013) Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: a pilot-study. *World J Gastroenterol*. **19**: 5837-5847.
- Tannock GW (2001) Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*. **73**: 410-414.
- Tannock G (1995) The normal microflora: An introduction to microbes inhabiting the human body. *Chapman and Hall, London*.
- Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Munoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J y Leclerc M (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*. **11**: 2574-2584.
- Teitelbaum JE y Walker WA (2002) Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr*. **22**: 107-138.
- Tian N, Wei G, Schuppan D y Helmerhorst EJ (2014) Effect of *Rothia mucilaginosa* enzymes on gliadin (gluten) structure, deamidation, and immunogenic epitopes relevant to celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **307**: 769-776.
- Tiruppathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V y Leibach FH (1993) Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides. *Am J Physiol*. **265**: 81-89.
- Tjellstrom B, Stenhammar L, Hogberg L, Falth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, Sundqvist T y Norin E (2005) Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am J Gastroenterol*. **100**: 2784-2788.
- Tome D (2013) Digestibility issues of vegetable versus animal proteins: protein and amino acid requirements--functional aspects. *Food Nutr Bull*. **34**: 272-274.
- Topping DL y Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. **81**: 1031-1064.
- Tsai F y Coyle WJ (2009) The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Curr Gastroenterol Rep*. **11**: 307-313.
- Tsuji M, Suzuki K, Kinoshita K y Fagarasan S (2008) Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. *Semin Immunol*. **20**: 59-66.
- Vader LW, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YM, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P y Koning F (2002) Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med*. **195**: 643-649.
- van Beek S y Priest FG (2002) Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl Environ Microbiol*. **68**: 297-305.
- van der Waaij D (1992) History of recognition and measurement of colonization resistance of the digestive tract as an introduction to selective gastrointestinal decontamination. *Epidemiol Infect*. **109**: 315-326.
- Vanhoof G, Goossens F, De Meester I, Hendriks D y Scharpe S (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J*. **9**: 736-744.

- Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekela I, Patrikainen H, Valve R, Maki M y Collin P (2009) Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol.* **9**: 49-230X-9-49.
- Volta U, Caio G, Tovoli F y De Giorgio R (2013) Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. *Cell Mol Immunol.* **10**: 383-392.
- Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A, Crespo Escobar P, Kolacek S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mummert E, Polanco I, Putter H, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Szajewska H, Werkstetter K, Greco L, Gyimesi J, Hartman C, Hogen Esch C, Hopman E, Ivarsson A, Koltai T, Koning F, Martinez-Ojinaga E, te Marvelde C, Pavic A, Romanos J, Stoopman E, Villanacci V, Wijmenga C, Troncone R y Mearin ML (2014) Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med.* **371**: 1304-1315.
- Wacklin P, Kaukinen K, Tuovinen E, Collin P, Lindfors K, Partanen J, Maki M y Matto J (2013) The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease. *Inflamm Bowel Dis.* **19**: 934-941.
- Walker JR, Altman RK, Warren JW y Altman E (2003) Using protein-based motifs to stabilize peptides. *J Pept Res.* **62**: 214-226.
- Wang M, Ahrne S, Jeppsson B y Molin G (2005) Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* **54**: 219-231.
- Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW y Zheng SS (2015) Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J Gastroenterol.* **21**: 803-814.
- Wang X, Heazlewood SP, Krause DO y Florin TH (2003) Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol.* **95**: 508-520.
- Watson CJ, Rowland M y Warhurst G (2001) Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol.* **281**: 388-397.
- Wellner N, Marsh JT, Savage AW, Halford NG, Shewry PR, Clare Mills EN y Belton PS (2006) Comparison of repetitive sequences derived from high molecular weight subunits of wheat glutenin, an elastomeric plant protein. *Biomacromolecules.* **7**: 1096-1103.
- Whitcomb DC y Lowe ME (2007) Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci.* **52**: 1-17.
- Wieser H (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **24**: 115-119.
- Wieser H (1996) Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl.* **412**: 3-9.
- Wieser H y Kieffer R (2001) Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *J Cereal Sci.* **34**: 19-27.
- Wieser H, Bushuk W y MacRitchie F (2006) Chapter 7: The Polymeric Glutenins. Gliadin and Glutenin: The Unique Balance of Wheat Protein. pp. 213-240.

- Wieser H, Mödl A, Seilmeier W y Belitz H (1987) High-performance liquid chromatography of gliadins from different wheat varieties: Amino acid composition and N-terminal amino acid sequence of components. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **185**: 371-378.
- Wilson M (2005) Microbial inhabitants of humans: Their ecology and role in health and disease. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, Buck F, Borowski P y Weber W (2002) The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. *J Biol Chem*. **277**: 11042-11049.
- Zamakhchari M, Wei G, Dewhirst F, Lee J, Schuppan D, Oppenheim FG y Helmerhorst EJ (2011) Identification of *Rothia* bacteria as gluten-degrading natural colonizers of the upper gastro-intestinal tract. *PLoS One*. **6**: e24455.
- Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP y Li HB (2015) Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int J Mol Sci*. **16**: 7493-7519.
- Zhu B, Wang X y Li L (2010) Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell*. **1**: 718-725.
- Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C y Young HA (2011) Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett*. **309**: 119-127.
- Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MA, Pajecki D, Moura EG, Alves PR, Maluf Filho F, de Souza JA y Gama-Rodrigues J (2007) Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo)*. **62**: 47-54.
- Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, Buning J, Lerch MM, Ciclitira PC, Weber P y Naim HY (2010) Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut*. **59**: 300-310.

VIII. ANEXOS

ANEXO I. Individuos incluidos en el estudio.

Id	Sexo	Edad	Diagnóstico	Analizado por cultivo	Analizado por DGGE
8	Hombre	41	Familiar	+	+
10	Hombre	43	Familiar	-	+
12	Hombre	43	Familiar	+	+
14	Hombre	46	Familiar	-	+
15	Mujer	40	Familiar	-	+
16	Hombre	42	Familiar	+	+
17	Mujer	58	Celiaco DSG	+	+
18	Mujer	33	Celiaco activo	+	+
19	Hombre	23	Sano	+	+
21	Mujer	43	Celiaco DSG	-	+
22	Mujer	44	Familiar	-	+
23	Mujer	38	Sano	+	+
24	Mujer	43	Familiar	-	+
25	Hombre	45	Celiaco DSG	+	+
26	Mujer	45	Familiar	-	+
27	Mujer	50	Celiaco DSG	+	+
28	Hombre	44	Sano	+	+
29	Mujer	42	Familiar	-	+
30	Hombre	41	Sano	+	+
31	Hombre	49	Familiar	-	+
32	Hombre	63	Sano	+	+
33	Hombre	44	Familiar	-	+
34	Mujer	37	Familiar	-	+
35	Hombre	45	Familiar	+	+
36	Hombre	44	Familiar	+	+
37	Hombre	25	Celiaco activo	+	+
38	Mujer	28	Familiar	+	+
39	Hombre	65	Familiar	+	+
40	Hombre	18	Celiaco DSG	+	+
42	Mujer	39	Familiar	+	+
43	Hombre	36	Familiar	+	+
44	Mujer	38	Familiar	+	+
45	Mujer	41	Celiaco DSG	+	+
46	Mujer	27	Celiaco DSG	+	+
47	Hombre	32	Familiar	+	+
48	Mujer	35	Celiaco activo	+	+
49	Mujer	29	Celiaco DSG	+	+
50	Mujer	43	Familiar	+	+
51	Hombre	45	Familiar	+	+
52	Hombre	43	Sano	+	+
53	Mujer	37	Familiar	+	+
54	Mujer	48	Familiar	+	+
55	Hombre	41	Familiar	+	+

Anexos

56	Hombre	41	Celiaco DSG	+	+
57	Mujer	44	Celiaco activo	+	+
58	Mujer	48	Celiaco DSG	+	+
59	Hombre	47	Sano	+	+
60	Mujer	69	Celiaco DSG	+	+
61	Hombre	61	Celiaco DSG	+	+
62	Mujer	30	Celiaco DSG	+	-
64	Hombre	66	Celiaco DSG	+	+
65	Mujer	29	Celiaco DSG	+	+
66	Mujer	38	Celiaco activo	+	+

ANEXO II. Secuencia del ADN ribosomal 16S. Se indica la posición de los cebadores empleados.

AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA

Cebador 27 F

AGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGT

V1

AATGTCTGGGAAACTGCCGTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAACCG

V2

CATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCA

GATGGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC

TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG

Cebador HDA1

CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAG

AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTT

V3

TGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT

Cebador HDA2

AATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTT

TGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAA

V4

GCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC

TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA

AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGAC

TTGGAGGTTTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTG

V5

GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTG

Cebador E939R

GAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGG

AAGTTTTTCAGAGATGAAAAGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT

V6

CGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCT

TTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAA

V7

GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAA

TGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGT

V8

AGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGA

TCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG

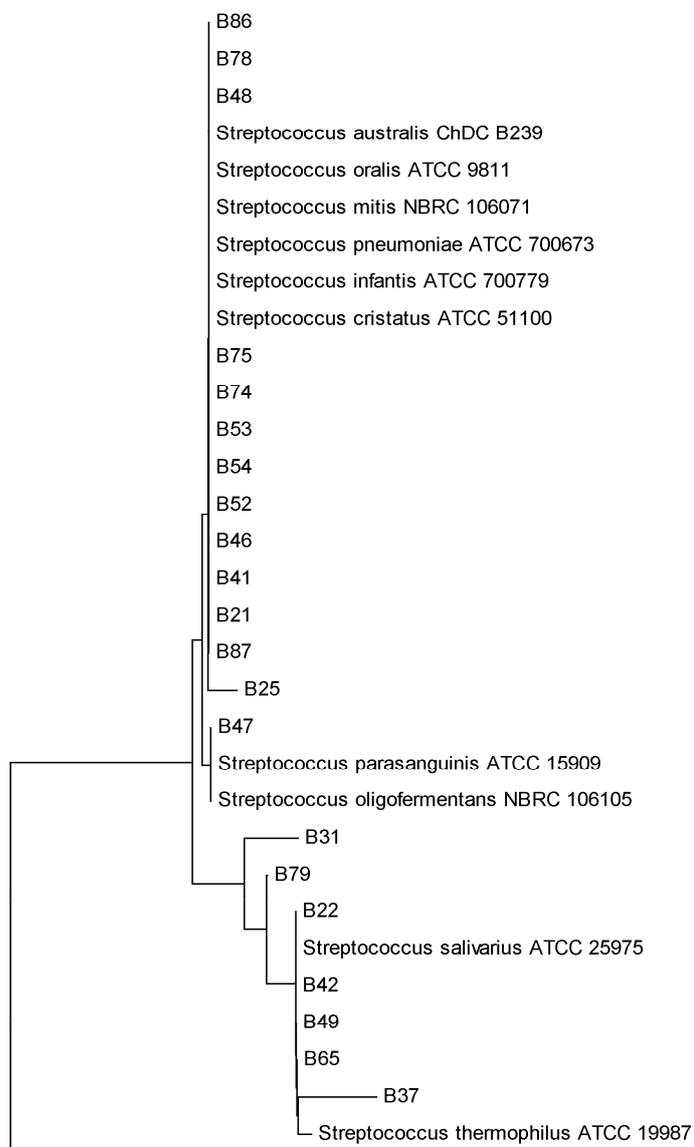
GAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTG

V9

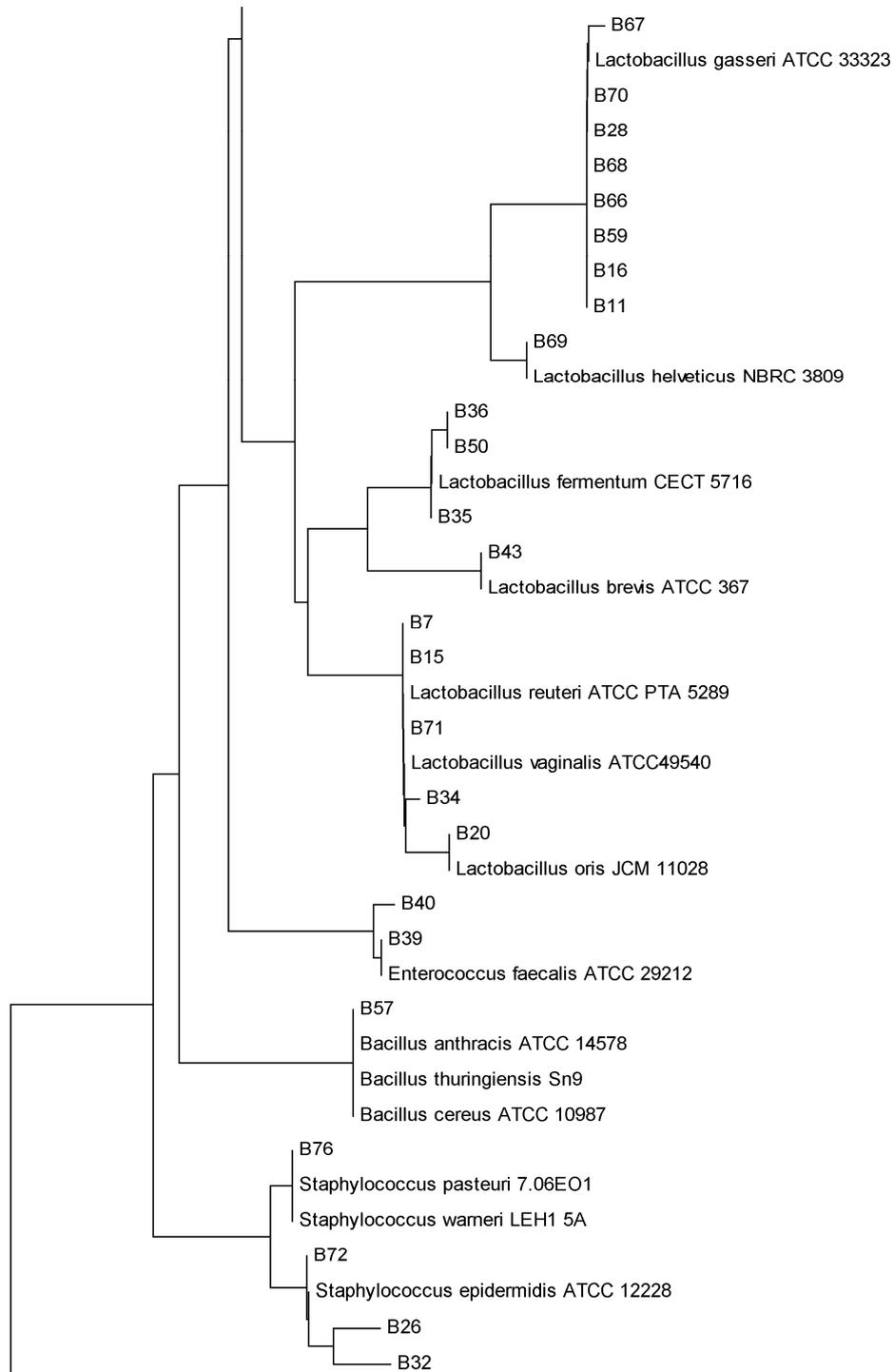
ATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCA

CCTCCT

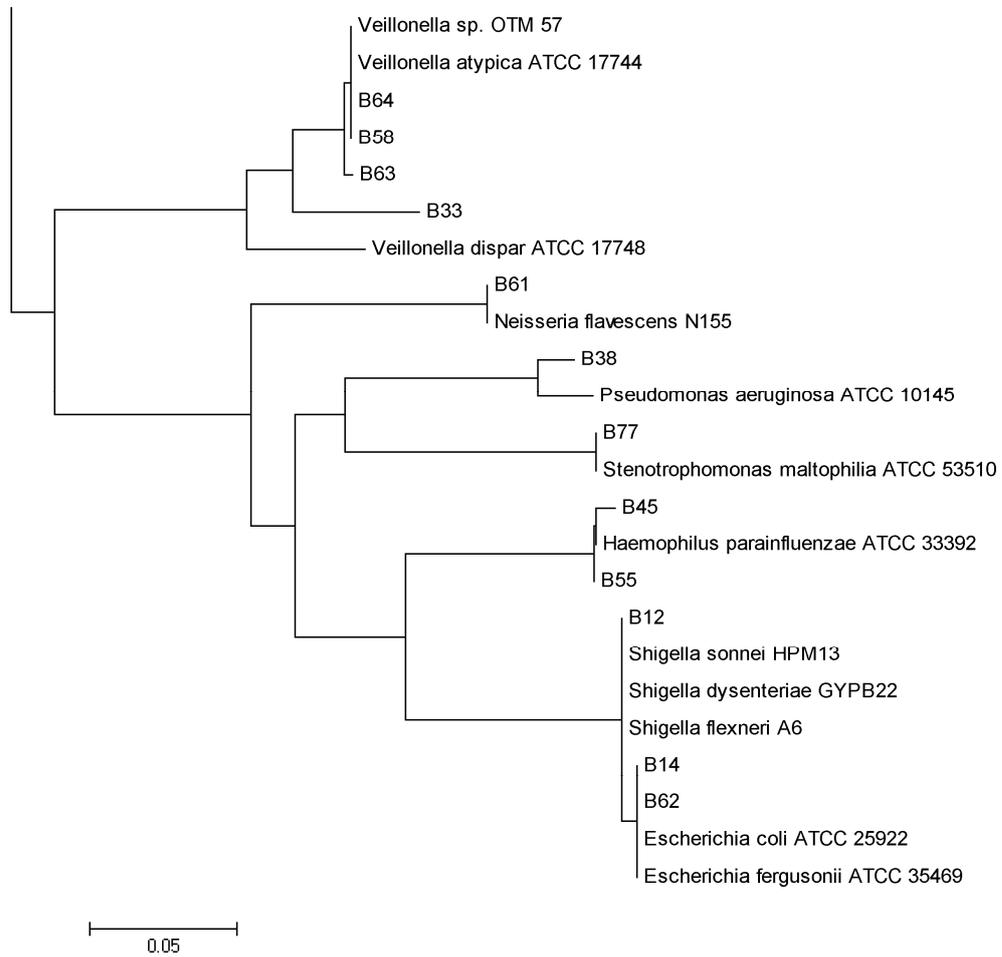
ANEXO III. Árbol filogenético construido con las secuencias de las bandas aisladas del PCR-DGGE.



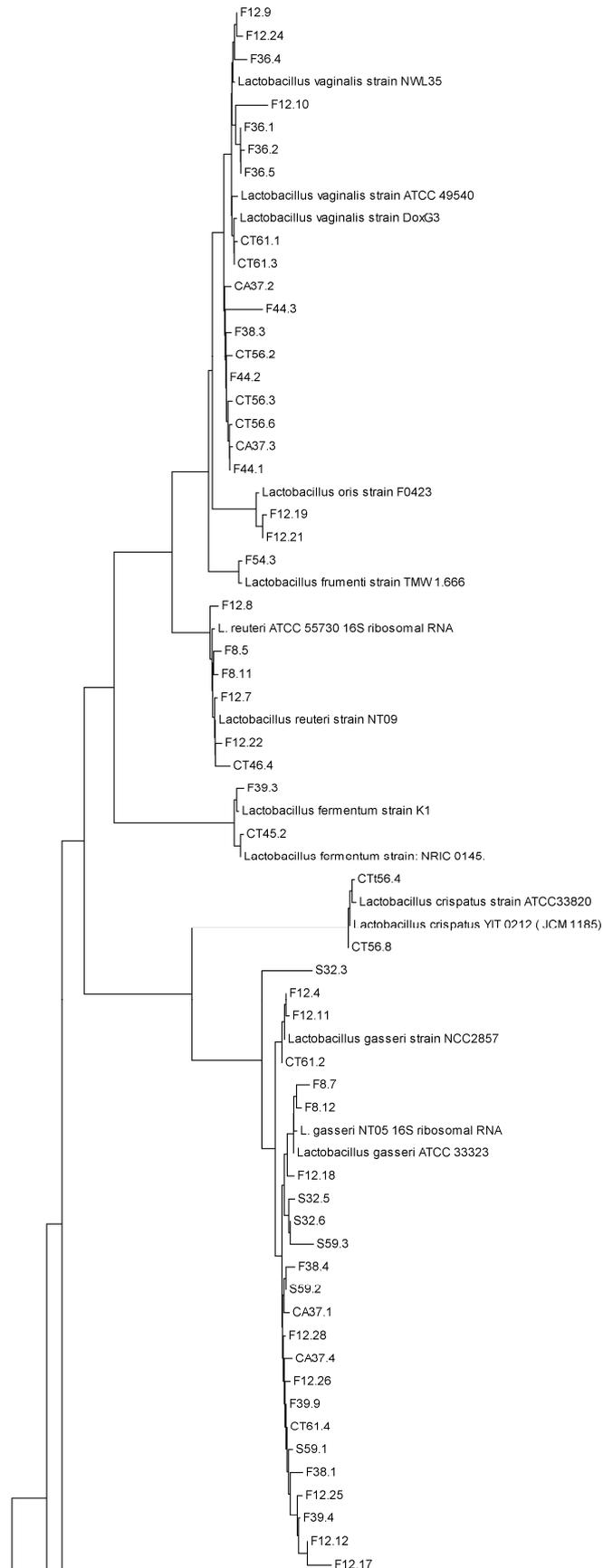
Continuación del ANEXO III. Árbol filogenético construido con las secuencias de las bandas aisladas del PCR-DGGE.



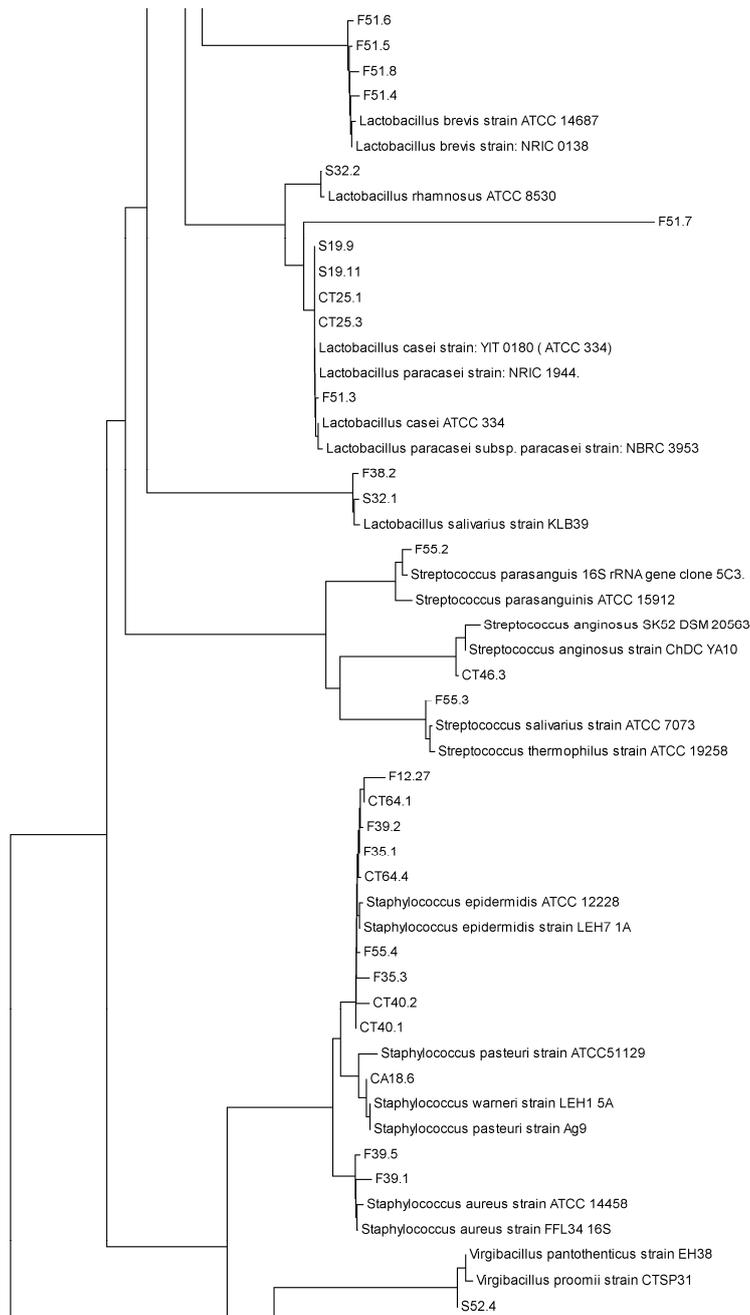
Continuación del ANEXO III. Árbol filogenético construido con las secuencias de las bandas aisladas del PCR-DGGE.



ANEXO IV. Árbol filogenético construido con las secuencias del ADNr 16S de los microorganismos aislados mediante cultivo de biopsias.



Continuación ANEXO IV. Árbol filogenético construido con las secuencias del ADNr 16S de los microorganismos aislados mediante cultivo de biopsias.



Continuación ANEXO IV. Árbol filogenético construido con las secuencias del ADNr 16S de los microorganismos aislados mediante cultivo de biopsias.

