



ANÁLISIS MOLECULAR DE LA MICROBIOTA DUODENAL DE NIÑOS Y ADULTOS CON Y SIN ENFERMEDAD CELIACA

Esther Nistal^{1,5}, Jenifer Pérez-Andrés¹, Alexandra R Herrán¹, Alberto Caminero⁴, Santiago Vivas^{3,5}, José M Ruiz de Morales^{2,5}, Ricardo Vicente Ullán⁶, y Javier Casqueiro^{1,4}

¹ Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León.

Departamento de ² Inmunología y ³ Gastroenterología, Hospital de León.

⁴ Instituto de Biología Molecular, Genómica y Proteómica (INBIOMIC), e

⁵ Instituto de Biomedicina (IBIOMED) Campus de Vegazana, Universidad de León.

⁶ Instituto de Biotecnología de León. León.

RESUMEN

El gluten, un componente muy común en la dieta humana, es capaz de activar la patogénesis de la enfermedad celiaca en individuos genéticamente predispuestos. Aunque se conoce muy bien la función de las enzimas digestivas humanas sobre las proteínas del gluten, existe un gran desconocimiento sobre el papel que lleva a cabo la microbiota intestinal en el metabolismo del mismo. El objetivo de este estudio fue analizar molecularmente mediante PCR-DGGE la microbiota duodenal que participa en el metabolismo del gluten. Para ello se cultivaron biopsias duodenales de niños y adultos en un medio de cultivo (MCB) que contenía gluten como única fuente de nitrógeno.

El análisis mediante PCR-DGGE mostró que la microbiota duodenal capaz de crecer en MCB está dominada por *Streptococcus salivarius* y *S. oralis*. Sin embargo, también se detectaron otros géneros como *Lactobacillus*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Clostridium*, *Granulicatella* y *Staphylococcus*, aunque con una frecuencia más baja. Por tanto, aunque no se pudo asociar ningún perfil electroforético a la enfermedad, sí que se ha observado una gran diversidad de bacterias duodenales que podrían estar involucradas en el metabolismo del gluten. Son necesarios más estudios que permitan caracterizar en detalle la microbiota duodenal asociada al metabolismo de gluten, con el fin de plantear en un futuro posibles alternativas terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado que aparece en individuos genéticamente susceptibles y es causada por una respuesta inmune inapropiada a las proteínas del gluten^(1,2). Actualmente, el único tratamiento efectivo para la EC es la eliminación total del gluten de la dieta durante toda la vida del paciente⁽³⁾.

El gluten está formado principalmente por proteínas, las cuales son resistentes a la digestión completa por las enzimas digestivas humanas debido a su alto contenido en prolina y glutamina. Como consecuencia de esta digestión parcial, se originan péptidos de gran tamaño que aparecen en el lumen intestinal, los cuales generan una respuesta inmune inadecuada en pacientes con EC⁽⁴⁾. Estudios recientes han mostrado que la microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica en el organismo humano, actuando en la digestión de componentes de la dieta, como polisacáridos complejos y, en menor medida, proteínas, entre las que se incluye el gluten⁽⁵⁾. Sin embargo, hay un conocimiento escaso sobre el papel que llevan a cabo los microorganismos en el metabolismo del gluten. Estudios recientes han mostrado que la microbiota intestinal puede ejercer un papel fundamental en la digestión de las proteínas del gluten y de los péptidos derivados. Aunque se considera que la digestión de los compuestos proteicos comienza en el estómago, se ha descrito una actividad proteolítica de origen bacteriano en la cavidad oral. Esta actividad es capaz de hidrolizar péptidos ricos en prolina como los que aparecen en las proteínas del gluten⁽⁶⁾. Dentro de las bacterias orales que generan esta actividad se han identificado *Rothia mucilaginosa* y *R. aeria*, las cuales son capaces de digerir eficientemente estas proteínas⁽⁷⁾. Curiosamente, especies de *Rothia* han sido también descritas en el duodeno⁽⁸⁾. Otras bacterias relacionadas con el metabolismo del gluten en la cavidad oral son *Streptococcus mitis*, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bifidobacterium longum* y *B. dentium*⁽⁷⁾. A esta idea se suma un estudio realizado por nuestro grupo, que ha descrito una actividad glutenásica fecal (AGF) relacionada directamente con la ingesta de gluten; dicha actividad podría ser derivada del metabolismo microbiano en el intestino⁽⁵⁾. Otros estudios muestran que cepas de *Bifidobacterium* y *Bacteroides fragilis*, aisladas de las heces humanas, son capaces de digerir péptidos derivados del gluten^(9,10). Caminero et al⁽¹¹⁾ mostraron una amplia variedad de microorganismos pertenecientes a

TRABAJO ENVIADO: 3-mayo-2015

ACEPTADO PARA SU PUBLICACIÓN: 28-junio-2015

CORRESPONDENCIA:

Esther Nistal
Área de Microbiología,
Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales.
Universidad de León.
Telf: 987 291 504;
esthernistal@hotmail.com

la microbiota fecal capaces de utilizar el gluten como nutriente, lo que apunta claramente a la gran importancia de la microbiota en el metabolismo del gluten. En consecuencia de este hecho y de acuerdo con las nuevas evidencias que señalan a una posible contribución bacteriana en el desarrollo de la EC ^(12, 13, 14, 15), nos planteamos estudiar molecularmente, mediante PCR-DGGE, la microbiota duodenal que participa en el metabolismo del gluten a partir del cultivo de biopsias de niños y adultos en un medio que contiene gluten como única fuente de nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y Muestras duodenales

Se recogieron biopsias duodenales de forma consecutiva de niños (rango de edad 1-12 años) y adultos (rango de edad entre 15-40 años) procedentes de los Servicios de Gastroenterología de adultos y pediátrica del Hospital de León que acudieron a la consulta con síntomas. 24 sujetos fueron incluidos en este estudio: 8 individuos adultos no enfermos celíacos (No-ECA) (4 hombres y 4 mujeres), 3 pacientes adultos enfermos celíacos activos (ECAA) (2 hombres y 1 mujer), 5 adultos enfermos celíacos tratados (ECTA) (2 mujeres y 3 hombres), 2 niños no enfermos celíacos (No-ECN) (1 niño y 1 niña) y 6 niños enfermos celíacos activos (ECAN) (4 niños y 2 niñas). Al diagnóstico, todos los pacientes celíacos presentaban datos clínicos compatibles con la enfermedad, como serología positiva (anticuerpos transglutaminasa), genética positiva (HLA-DQ2-DQ8), y alteraciones histológicas en la mucosa de la biopsia duodenal. Las muestras de los pacientes ECA fueron recogidas en el momento del diagnóstico antes de comenzar la dieta sin gluten. Los pacientes ECT en el momento de la toma de la biopsia llevaban más de un año en dieta sin gluten. En el caso de los individuos No-EC, las muestras de biopsias duodenales fueron obtenidas de pacientes que fueron referidos a las consultas de gastroenterología debido a otras patologías intestinales (diarrea crónica, hernia de hiato, etc.). Ninguno de los individuos incluidos en el estudio fue tratado con antibióticos durante al menos un mes antes de la toma de las muestras. Las biopsias fueron recogidas mediante pinza de biopsia convencional a través del canal de trabajo de un videogastropico. En el caso de los niños se utilizó un fibrogastropico pediátrico con una pinza de menor tamaño adaptada para el canal de trabajo. En los niños se utilizó siempre sedación profunda que practicó un pediatra entrenado en la UCI pediátrica. En los adultos se ofrecía sedación profunda con propofol que controlaba el propio endoscopista que tomaba la biopsia. En total se tomaban 2 biopsias en los adultos y 3 en los niños de la segunda y tercera porción duodenal. Estas biopsias eran las primeras en tomarse, antes de las enviadas para anatomía patológica, y evitar así contaminaciones. Según eran tomadas las biopsias,

se inoculaba directamente en un tubo de ensayo con 1 cc de suero salino. Estas muestras eran procesadas de forma inmediata a temperatura ambiente. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado tanto de los padres de los niños, como de los pacientes adultos incluidos en el estudio a la toma de muestras. Los protocolos de estudio fueron aprobados por la comisión de ética del Hospital de León. Todas las muestras fueron extraídas mediante endoscopia alta con biopsia de la 2^a-3^a porción duodenal y fueron procesadas de inmediato.

Medio de cultivo y condiciones de cultivo

Para el aislamiento de los microorganismos a partir del cultivo de biopsias se empleó el medio líquido MCB diseñado en nuestro laboratorio que contiene gluten como única fuente de nitrógeno: CaCl₂ 2mM, ZnSO₄ 2mM, Glucosa 2%, Tween 80 0.1% (v/v), FeCl₃ 20μM, Gluten (Sigma-Aldrich) 3%, y digerido de gluten con pepsina 0.5%. El pH fue ajustado a 6,5 con un tampón fosfato (1%). El medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121°C. Seguidamente mediante cultivo en placa se comprobó que el medio estaba totalmente estéril.

El digerido de gluten al 3% (100 mL) se obtuvo al incubar 3 g de gluten con 1 g de pepsina a pH 2 ajustado con HCl (10M). La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación (250 rpm). Seguidamente se elevó el pH a 6,5 con NaOH (1M) y posteriormente se esterilizó a 121°C en el autoclave durante 20 minutos.

La biopsia se inoculó en un matraz con 10 mL de medio de cultivo y se incubó durante 48 horas a 37°C con agitación (100 rpm) en condiciones microaeróbicas.

Extracción de ADN de los cultivos de biopsia y amplificación por PCR

Las extracciones de ADN genómico de los cultivos de biopsia se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del protocolo del kit SpeedTools Tissue DNA Extraction (Biotools, España). La concentración de ADN fue determinada empleando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Saveen&Werner, Limhamn, Suecia).

Para caracterizar molecularmente la microbiota duodenal se amplificó mediante PCR dos regiones variables de diferente tamaño del ADN ribosomal 16S y así poder comparar los resultados obtenidos con ambos fragmentos. Para la amplificación de los genes del ARNr 16S ello se emplearon dos parejas de cebadores. la pareja de oligonucleótidos HDA1GC y HDA2 ⁽¹⁶⁾ que amplifican un fragmento de unos 200 pb correspondientes a la región V3 del ADNr 16S y la pareja de cebadores F968GC y R1401 ⁽¹⁷⁾ que amplifican un fragmento de aproximadamente 450 pb de la región V6-V8 del ADNr 16S. Para dichas amplificaciones se usó el kit comercial iProof High-Fidelity Master Mix (BioRad). El programa de PCR que se utilizó para este kit consistió en una desnatura-

lización inicial de 98°C durante 30 segundos y a partir de aquí 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 98°C durante 10 segundos, 56°C ó 55°C durante 30 segundos y 72°C, 30 segundos. El programa de PCR finalizó con una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Análisis de la microbiota obtenida a partir del cultivo de biopsias duodenales mediante electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los productos de PCR de la región V3 y V6-V8 del ADN_r 16S fueron separados mediante la técnica del DGGE en geles del 10% y 8% de acrilamida/bisacrilamida en un gradiente desnaturalizante de urea (7M) y formamida (40% v/v) del 35-55% y 40-60% respectivamente. El análisis de DGGE de los productos de PCR se realizó en el aparato DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Richmond, CA), a un voltaje constante de 70 V y una temperatura de 60°C durante 15 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio durante 30 minutos y visualizados bajo un transiluminador con luz ultravioleta. Las bandas de interés fueron cortadas del gel de poli-acrilamida con un cubre estéril bajo luz ultravioleta e incubadas en 20 µL de agua milliQ estéril a 4°C durante toda la noche. Alícuotas de 5 µL fueron empleadas como molde en una nueva reacción de PCR. Se llevó a cabo la reamplificación de la región ribosomal con el par de oligonucleótidos correspondiente pero sin portar la cola de poli-GC. Los fragmentos reamplificados fueron purificados y clonados con el sistema StrataClone PCR Cloning (Stratagene, La Jolla, CA) para posteriormente ser secuenciados en

el Servicio de secuenciación de la Universidad de León y estas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos de GeneBank con el algoritmo del BLASTn. Para completar la identificación molecular de estas secuencias, se llevó a cabo un análisis filogenético. Las secuencias con un porcentaje $\geq 97\%$ de identidad con respecto a las secuencias de bacterias conocidas después del análisis filogenético fueron consideradas de la misma especie.

Análisis estadístico

Las diferencias en número de especies entre los distintos grupos de poblaciones fueron analizadas empleando el test "chi-cuadrado" (se aplicó la corrección de Yates). La significación estadística fue establecida para valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Análisis molecular mediante PCR-DGGE de la región V3 del ADN_r 16S

En la **Figura 1** se observan los perfiles de DGGE obtenidos a partir de los productos de PCR de la región V3 empleando como molde el ADN de los cultivos de biopsias duodenales. Los diferentes perfiles mostraron entre 1 a 5 bandas intensas y bien resueltas. El resto de las bandas eran tenues o daban lugar a un smear. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de bandas entre los perfiles electroforéticos de individuos sanos y de enfermos celíacos, tanto activos como tratados, ni tampoco se apreciaron diferencias asociadas a la edad.

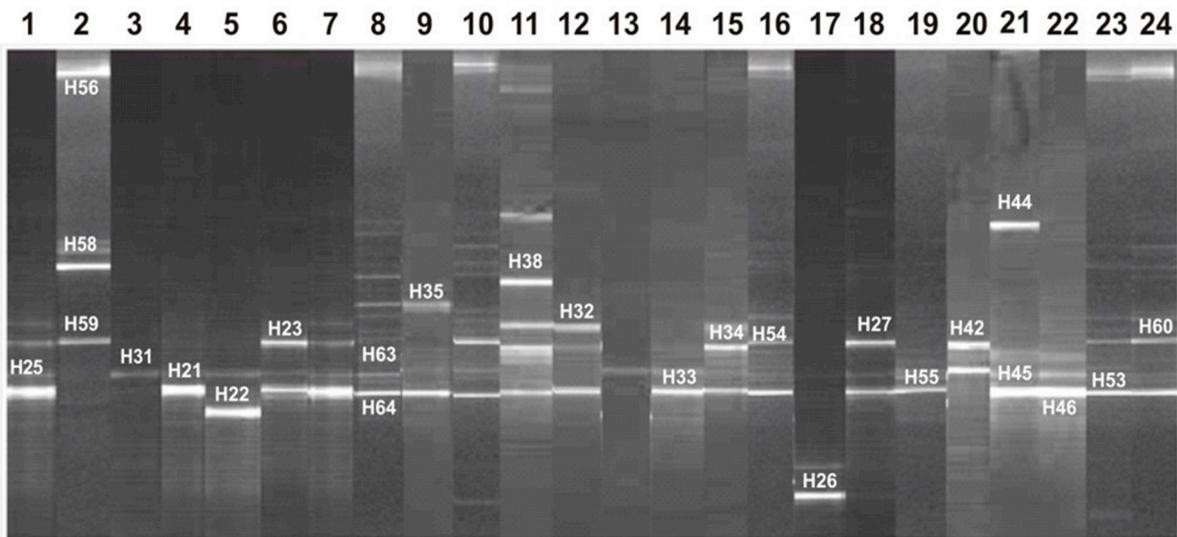


Figura 1.- Perfiles de DGGE de las comunidades de bacterias obtenidas a partir del cultivo en un medio con gluten de biopsias procedentes de niños no enfermos celíacos (No-ECN) (carriles 1 y 2), niños enfermos celíacos activos (ECAN) (carriles desde el 3 al 8), adultos no enfermos celíacos (No-ECA) (carriles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

TABLA I

**ESPECIES DEL DOMINIO BACTERIA IDENTIFICADAS
A PARTIR DE LA SECUENCIACIÓN DE BANDAS DE DGGE AMPLIFICADAS
A PARTIR DEL ADN DEL CULTIVO DE BIOPSIAS DUODENALES CON
LOS OLIGONUCLEÓTIDOS HDA1GC/HDA2.**

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

Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinado por la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

TABLA II

**FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES
IDENTIFICADAS MEDIANTE PCR-DGGE EMPLEANDO
LOS CEBADORES UNIVERSALES HDA1GC/HDA2 A PARTIR
DEL ADN EXTRAÍDO DEL CULTIVO DE BIOPSIAS DUODENALES**

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

Niños no enfermos celíacos (No-EC_N).

Adultos no enfermos celíacos (No-ECA)

Niños enfermos celíacos activos (ECA_N).

Adultos enfermos celíacos activos (ECA_A) Adultos enfermos celíacos tratados (ECT_A).

Se seleccionaron varias bandas para llevar a cabo su identificación molecular. Los productos de PCR que fueron identificados por secuenciación a partir de las

bandas del DGGE aparecen en la **Tabla I**. Para completar la identificación molecular de cada una de las bandas secuenciadas se llevó a cabo un análisis filogenético.

La frecuencia de las diferentes especies detectadas mediante PCR-DGGE se muestra en la **Tabla II**. Dentro de las diferentes especies identificadas, predominó *Streptococcus salivarius* y *S. oralis* que se detectaron en prácticamente todos los individuos, tanto niños como adultos

independientemente de la enfermedad. Por el contrario, *Bacillus cereus*, *Haemophilus influenza*, *Lactobacillus mucosae* y *Staphylococcus epidermidis* sólo fueron detectados a partir del cultivo de biopsias de niños, pero con una frecuencia muy baja. A partir del cultivo de biopsias proce-

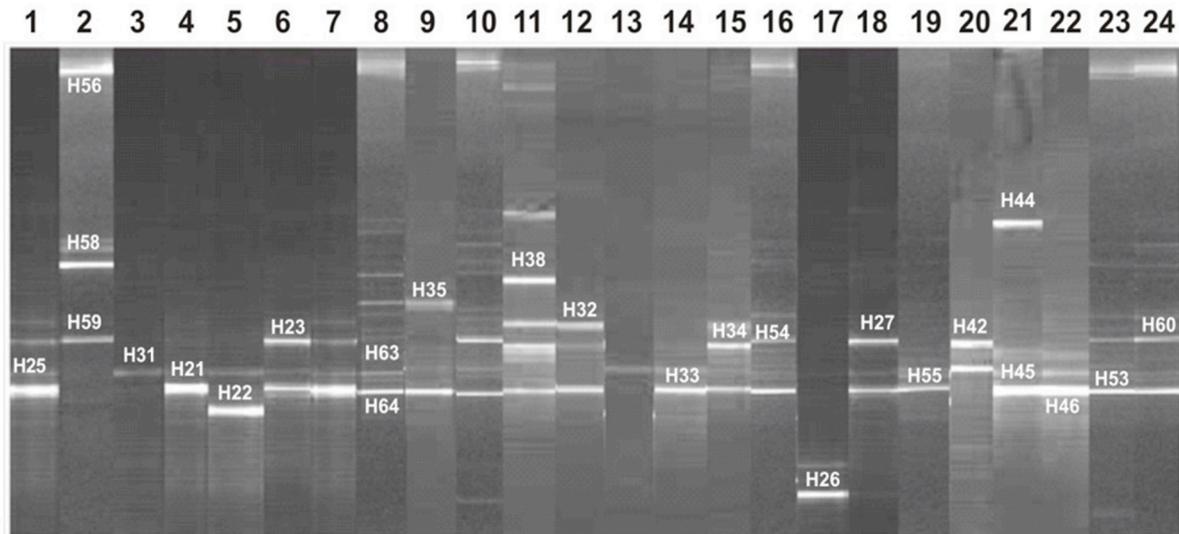


Figura 2.- Perfiles de DGGE de las comunidades de bacterias obtenidas a partir del cultivo de biopsias en un medio con gluten de niños no enfermos celíacos (No-ECN) (carriles 1 y 2), niños enfermos celíacos activos (ECAN) (carriles del 3 al 8), adultos no enfermos celíacos (No-ECA) (carriles del 9 al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

TABLA III

**ESPECIES DEL DOMINIO BACTERIA IDENTIFICADAS
A PARTIR DE LA SECUENCIACIÓN DE BANDAS DE DGGE AMPLIFICADAS
A PARTIR DEL ADN DEL CULTIVO DE BIOPSIAS DUODENALES CON
LOS OLIGONUCLEÓTIDOS F968GC/R1401.**

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

Entre paréntesis se indica el número de acceso de los parientes más próximos determinado por la búsqueda de secuencias similares con el GenBank empleando el algoritmo BLASTN.

dentes de individuos adultos, también aparecieron con baja frecuencia especies como *Clostridium perfringens*, *Granulicatella elegans* o *G. adiacens*, *Lactobacillus crispatus* y *L. gasseri*.

Análisis molecular mediante PCR-DGGE de la región V6-V8 del ADNr 16S

Los productos de PCR generados por los cebadores F968GC/R1401 fueron separados mediante DGGE en geles del 8% de acrilamida/bisacrilamida en un gradiente desnaturante del 40-60% de urea y formamida. Como se observa en la **Figura 2**, los patrones de bandas de DGGE obtenidos con los cebadores universales correspondientes a la región V6-V8 del ADNr 16S, mostraron muy pocas bandas (entre 1 a 4 bandas), pero la gran mayoría estaban bien resueltas. No se pudo asociar ningún perfil electroforético a la enfermedad. Tampoco se observaron diferencias en cuanto a número de bandas presentes en los perfiles electroforéticos de niños y de adultos, ni entre sanos y enfermos.

A partir de los geles, se seleccionaron varias bandas para llevar a cabo su identificación molecular. Los productos de PCR que fueron identificados por secuenciación a partir de las bandas del DGGE aparecen en la **Tabla III**. La frecuencia de cada una de esas bandas se muestra en la **Tabla IV**. Los resultados fueron similares a los obtenidos con los cebadores que amplifican la región V3, ya que las especies identificadas fueron las

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

DISCUSIÓN

El conocimiento de las bacterias duodenales involucradas en el metabolismo del gluten es escaso. Es importante estudiar qué bacterias participan y cómo participan puesto que las proteínas del gluten son responsables de la activación de la patogénesis de la EC. Para el estudio de estas bacterias duodenales se ha empleado un medio de cultivo diseñado en nuestro laboratorio, el MCB, que lleva gluten como única fuente de nitrógeno, lo que va a permitir la proliferación de bacterias capaces de emplear las proteínas del gluten como nutriente. El análisis mediante PCR-DGGE mostró que la microbiota duodenal capaz de crecer en el MCB está dominada por *Streptococcus salivarius* y *S. oralis*, ya que fueron identificados en el 71% y 50% (respectivamente) de los cultivos de biopsias analizados. La predominancia del género *Streptococcus* en el duodeno ha sido refle-

TABLA IV
FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES IDENTIFICADAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LAS DIFERENTES BANDAS OBTENIDAS EMPLEANDO LOS CEBADORES UNIVERSALES F968GC/R1401 A PARTIR DEL ADN EXTRAÍDO DEL CULTIVO DE BIOPSIAS DUODENALES

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

Niños no enfermos celíacos (No-EC_N).

Adultos no enfermos celíacos (No-ECA)

Adultos enfermos celíacos tratados (ECT_A).

Niños enfermos celíacos activos (ECA_N).

Adultos enfermos celíacos activos (ECA_A)

jada previamente en varios trabajos que han empleado técnicas clásicas de cultivo para identificar la microbiota duodenal^(18, 19). Además, estudios de caracterización de la microbiota intestinal involucrada en el metabolismo del gluten en la cavidad oral y el intestino grueso han mostrado la presencia de cepas de *Streptococcus* capaces de hidrolizar el gluten^(11, 20, 21). Por tanto, estas bacterias duodenales podrían jugar un papel importante en el metabolismo del gluten, participando en la hidrólisis bacteriana de péptidos inmunogénicos del gluten en el intestino delgado. En los últimos años, varias bacterias capaces de digerir gluten han sido propuestas como posible tratamiento de la EC^(21, 22); sin embargo ninguna de ellas es miembro hospedador de la microbiota duodenal, lo que dificulta su uso clínico. Así mismo, diferentes estudios han descrito que determinadas cepas de *Streptococcus salivarius* pueden ser empleadas como probióticos, ya que son capaces de inducir una respuesta anti-inflamatoria y ejercer un efecto protector frente a la apoptosis inducida por patógenos^(23, 24).

Otros géneros como *Lactobacillus*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Clostridium*, *Granulicatella* y *Staphylococcus* también se detectan mediante PCR-DGGE, aunque con una frecuencia más baja. Lo que caracteriza a todos estos microorganismos, es que son capaces de crecer sobre un medio de cultivo que contiene el gluten como única fuente de nitrógeno. Esto puede ser explicado por diferentes razones; i) presentan actividad proteolítica frente al gluten; ii) por el contrario carecen de esa actividad, pero son capaces de crecer en ese medio gracias a los nutrientes que le aportan otros microorganismos que si son capaces de hidrolizar el gluten; iii) o su crecimiento se ve favorecido, porque son capaces de emplear los péptidos de menor tamaño que se originan como consecuencia de la digestión parcial del gluten con pepsina. Estudios previos han mostrado distintas cepas bacterianas de géneros como *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Staphylococcus* son capaces de hidrolizar gluten⁽¹¹⁾. Por tanto, estos microorganismos pueden tener un papel en el metabolismo del gluten en el duodeno.

Varios trabajos han mostrado una disbiosis intestinal en pacientes con EC⁽¹²⁻¹⁵⁾. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden participar en la patogénesis se desconocen. Se ha mostrado que algunos de los grupos bacterianos alterados en la EC están relacionados con el metabolismo del gluten^(11, 13, 14, 25, 26). Así mismo, Bernardo et al,⁽²⁷⁾ mostraron la existencia de un patrón específico de metaloproteasas bacterianas con capacidad de degradar gliadina en la mucosa duodenal de pacientes con EC diferente al patrón presente en los sanos. Nuestro trabajo teniendo en cuenta el número reducido de pacientes analizados de cada tipo, no muestra un perfil de especies bacterianas asociadas a la EC o a los individuos no enfermos celíacos. Quizás las diferencias podrían estar asociadas a la funcionalidad

de las distintas cepas que son capaces de crecer en el medio MCB. Los enterotipos que determinan la microbiota intestinal, en la mayoría de los casos se definen por la composición de especies. Pero las funciones moleculares no siempre son llevadas a cabo por las especies más abundantes. Por ello resulta necesario llevar a cabo también un análisis funcional para poder entender el papel de las comunidades microbianas⁽²⁸⁾. Además, la técnica PCR-DGGE es capaz de detectar entre el 90-99% de las especies más representativas de una comunidad, sin discriminar entre células vivas, células muertas o células en un estado no cultivable. Sin embargo, esta técnica no refleja la presencia de otras especies de bacterias menos representativas que si pueden ser detectadas mediante colecciones de clones o mediante técnicas clásicas de cultivo^(29, 30).

La baja diversidad bacteriana obtenida con el medio MCB puede deberse a las condiciones adversas que presenta el duodeno como por ejemplo pH ácido, peristaltismo o la presencia de ácidos biliares. Además, se ha utilizado un medio de cultivo de enriquecimiento con gluten, el cual se caracteriza por presentar secuencias peptídicas de difícil digestión. Por estos motivos, es posible que una parte de los microorganismos presentes en el duodeno no puedan crecer en el medio de cultivo MCB. Nistal et al,⁽⁶⁾ mostraron que una parte importante de la microbiota duodenal de los adultos está formada por bacterias aún no cultivadas. A menudo, para el cultivo de microorganismos del tracto gastrointestinal se emplean medios de cultivo complejos (como por ejemplo Brain Heart Infusion broth, Brucella broth, etc.)^(31, 32) que se caracterizan por ser medios ricos en nutrientes ya que en su composición se incluyen hidrolizados de productos animales o vegetales, como caseína, carne, soja, extracto de levaduras u otras sustancias nutritivas que favorecen el crecimiento de muchos microorganismos. Sin embargo, el medio MCB carece de esos componentes, lo que hace que se trate de un medio de cultivo más exigente para el crecimiento de los microorganismos. Esto permite la proliferación y caracterización de bacterias que directa o indirectamente están involucradas en el metabolismo del gluten.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria cofinanciado por FEDER (FIS P110/02447) y por un proyecto de la Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad (Ref. 520/A/10). Esther Nistal y Alexandra Rodríguez recibieron una beca de la Junta de Castilla y León, cofinanciada por el Fondo Social Europeo. Jénifer Pérez-Andrés recibió una beca del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España

BIBLIOGRAFÍA

- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 2012;62(1):43-52.
- Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(1):1-19.
- Ciclitira PJ, Johnson MW, Dewar DH, Ellis HJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 421-58.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 297: 2275-9.
- Caminero A, Nistal E, Arias L, Vivas S, Comino I, Real A, et al. A gluten metabolism study in healthy individuals shows the presence of faecal glutenase activity. *Eur J Nutr*, 2012; 51(3): 293-9.
- Helmerhorst EJ, Zamakhchari M, Schuppan D, Oppenheim FG. Discovery of a novel and rich source of gluten-degrading microbial enzymes in the oral cavity. *PLoS One* 2010; 5(10): e13264.
- Zamakhchari M, Wei G, Dewhirst F, Lee J, Schuppan D, Oppenheim FG, et al. Identification of *Rothia* bacteria as gluten-degrading natural colonizers of the upper gastro-intestinal tract. *PLoS One* 2011; 6(9): e24455.
- Nistal E, Caminero A, Herrán AR, Arias L, Vivas S, de Morales JM et al. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(4): 649-56.
- Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem* 2010; 109(4): 801-7.
- Sánchez E, Laparra JM, Sanz Y. Discerning the Role of *Bacteroides fragilis* in Celiac Disease Pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(18): 6507-15.
- Caminero A, Herrán AR, Nistal E, Pérez-Andrés J, Vaquero L, Vivas S, et al. Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 88: 309-19.
- Forsberg G, Fahlgren A, Horstedt P, Hammarstrom S, Hernell O, Hammarstrom ML. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 894-904.
- Collado MC, Calabuig M, Sanz Y. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol* 2007; 8: 9-14.
- Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1669-74.
- Sanz Y, Nadal I, Sánchez E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2007;2:148-56.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:297-303.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Oyaizu H. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:113-21.
- Sullivan A, Tornblom H, Lindberg G, Hammarlund B, Palmgren AC, Einarsson C, et al. The micro-flora of the small bowel in health and disease. *Anaerobe* 2003;9:11-4.
- Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MA, Pajeci D, Moura EG, Alves PR, et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo)* 2007;62:47-54.
- Fernandez-Feo M, Wei G, Blumenkranz G, Dewhirst FE, Schuppan D, Oppenheim FG, et al. The cultivable human oral gluten-degrading microbiome and its potential implications in coeliac disease and gluten sensitivity. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E386-94.
- Tian N, Wei G, Schuppan D, Helmerhorst EJ. Effect of *Rothia mucilaginosa* enzymes on gliadin (gluten) structure, deamination, and immunogenic epitopes relevant to celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G769-76.
- Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. Bifidobacterium longum CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PLoS One* 2012;7: e30744.
- Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, Gardy JL, Chikatamarla A, Gellatly S, et al. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun* 2008;76:4163-75.
- Slieden I, Van Damme J, Van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res* 2009;88:1026-30.
- Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51:562-8.
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* 2009;62:264-9.
- Bernardo D, Garrote JA, Nadal I, León AJ, Calvo C, Fernández-Salazar L, et al. Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa. *Gut* 2009;58:886-7.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-80.
- Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G. 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* 2001;67:5113-21.
- Van Beek S, Priest FG. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:297-305.
- Yun JH, Yim DS, Kang JY, Kang BY, Shin EA, Chung MJ, et al. Identification of *Lactobacillus ruminus* SPM0211 isolated from healthy Koreans and its antimicrobial activity against some pathogens. *Arch Pharm Res* 2008;28:660-6.
- Sainsus N, Cattori V, Lepadatu C, Hofmann-Lehmann R. Liquid culture medium for the rapid cultivation of *Helicobacter pylori* from biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:1209-17.