



CONFERENCIA INAUGURAL

Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota

Alberto Caminero y Elena F. Verdú

Farncombe Family Digestive Health Research Institute and Division of Gastroenterology, McMaster University, Hamilton, Canadá

Introducción

El gluten es el factor ambiental desencadenante de la enfermedad celíaca (EC). Sin embargo, un pequeño porcentaje de la población genéticamente susceptible desarrolla EC al ingerir gluten. Se ha especulado que otros factores ambientales –tales como patrones de lactancia materna, infecciones microbianas o alteraciones de la microbiota intestinal (disbiosis)– pueden tener un papel importante¹. Varias son las evidencias que apuntan a la microbiota intestinal como un componente clave en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, se ha descrito una asociación entre el riesgo de sufrir EC con el consumo de medicamentos como inhibidores de la bomba de protones, el uso de cesárea durante el parto, así como con la presencia de infecciones virales durante la infancia²⁻⁴. Todos estos factores van acompañados de una alteración de la microbiota intestinal. Además, se ha descrito una disbiosis en pacientes celíacos caracterizada por un incremento del grupo Proteobacteria⁵.

Nuestros estudios han mostrado que la sensibilidad al gluten es dependiente de la composición bacteriana del intestino en un modelo murino descrito en nuestro laboratorio, produciéndose una modulación tanto positiva como negativa a la respuesta al gluten. La sensibilización de ratones libres de bacterias con gluten y toxina colérica durante 3 semanas, seguida de una exposición al gluten durante 2 semanas, produjo un incremento en el número de linfocitos intraepiteliales del duodeno y de anticuerpos séricos anti-gliadina, así como una reducción de la proporción vellosidad/crypta en ratones con una predisposición genética (NOD/DQ8). Sin embargo, este fenotipo desaparece cuando la sensibilización y exposición al gluten se lleva a cabo en ratones colonizados con una microbiota definida y libre de Proteobacteria. En cambio, la presencia de Proteobacteria en co-

munidades microbianas libres de patógenos (SPF, del inglés *specific pathogen free*) facilita el desarrollo de la inmunopatología en ratones NOD/DQ8 después de la sensibilización y la exposición al gluten. Además, la expansión de Proteobacteria tras la exposición de dichos ratones SPF NOD/DQ8 a antibióticos (vancomicina) durante el período neonatal incrementó la respuesta frente al gluten. Por último, la suplementación de una cepa de *Escherichia coli* (ENT CAI:5) –representante característica del filo Proteobacteria– que se aisló de muestras fecales de pacientes celíacos, también hace a los ratones originalmente libres de Proteobacteria más susceptibles al gluten en nuestro modelo murino de sensibilización al gluten⁶. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la microbiota intestinal puede afectar al desarrollo de la EC han sido una incógnita durante mucho tiempo. Nuestro laboratorio ha estado trabajando en varias líneas independientes con el objetivo de dilucidar los mecanismos que se esconden tras esta compleja asociación entre la EC y las alteraciones de la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal y la activación del sistema inmune humano

El papel de la microbiota intestinal en la salud y la enfermedad ha sido una de las áreas más estudiadas en la última década y su contribución en la sensibilidad a alimentos y en trastornos autoinmunes como la EC está emergiendo. Varios modelos de activación/inactivación del sistema inmune por la microbiota han sido descritos en otras enfermedades digestivas, como las enfermedades inflamatorias intestinales. Sin embargo, en EC no hay muchos trabajos centrados en este punto. Se ha especulado que las infecciones, como la producida por el hongo *Candida albicans*, pueden ser un fac-

tor desencadenante de la EC. Los autores describieron una proteína fúngica de dicho hongo con una secuencia aminoácida análoga a la gliadina, y sustrato a su vez de la enzima transglutaminasa-2 humana, que podría llevar a una reacción cruzada en pacientes con EC⁷. Sin embargo, este modelo no ha sido completamente demostrado. Por otro lado, varios trabajos insisten en la asociación entre la EC con infecciones virales⁸. Se ha mostrado una relación entre la infección por rotavirus y el riesgo de padecer EC en niños. Los rotavirus son una de las causas más frecuentes de infecciones gastrointestinales en niños y son capaces de inducir procesos inflamatorios, cambios estructurales en el intestino y un aumento de la permeabilidad intestinal. A nivel bacteriano se ha descrito que una disbiosis intestinal –liderada muchas veces por un incremento de Proteobacteria, así como un sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado– puede participar en la aparición de la EC^{9,10}. Además, algunos trabajos han descrito una mayor expresión de genes de virulencia procedentes de la microbiota de pacientes con EC¹¹. Un reciente trabajo muestra que un miembro de Proteobacteria como *Neisseria flavescens*, el cual está incrementado en pacientes celíacos, es capaz de generar un fenotipo proinflamatorio en células dendríticas y producir un incremento de citocinas proinflamatorias en mucosas duodenales de pacientes celíacos. Los autores especulan con el proceso de captación de hierro por la bacteria desde el hospedador como el factor mediante el cual la bacteria puede generar su virulencia⁹.

En esta dirección, nuestro laboratorio ha llevado a cabo trabajos con *Pseudomonas aeruginosa*, una cepa bacteriana aislada en pacientes celíacos. Estudios preliminares han mostrado que la ingesta de gluten en ratones se acompaña de la proliferación de dicha bacteria en el intestino delgado. *P. aeruginosa* es capaz de digerir y utilizar el gluten dietético mediante su elastasa bacteriana. Esta proteasa específica es capaz de producir un incremento de linfocitos intraepiteliales en ratones tanto con como sin susceptibilidad genética a la sensibilidad al gluten. Sin embargo, *P. aeruginosa* solo induce una enteropatía caracterizada por un descenso en la relación vellosidad/cripta en ratones NOD/DQ8 con susceptibilidad. Estos resultados, presentados en forma preliminar en 2016 en el MICS (Mucosal Immunology Course and Symposium)¹², sugieren que proteasas bacterianas inducidas por el gluten pueden romper la tolerancia oral promoviendo respuestas inflamatorias de importancia en EC. Por tanto, la presencia de patógenos oportunistas en el intestino delgado puede estimular una respuesta inmune innata independiente del gluten, pero que puede ser potenciada por este.

La microbiota intestinal y el metabolismo del gluten

La toxicidad de las proteínas del gluten radica en la presencia en su secuencia aminoácida de regiones ricas en glutamina y prolina que le confieren resistencia a las enzimas digestivas humanas¹³. Como consecuencia, péptidos de gran tamaño como el 33-mer aparecen en el lumen intestinal que, una vez translocados a la lámina propia, son capaces de desencadenar la respuesta inmune característica de la

EC. Trabajos recientes han mostrado que el tracto digestivo humano es ampliamente colonizado por bacterias que son capaces de utilizar gluten en su metabolismo¹⁴. Nuestros resultados muestran que las bacterias intestinales contribuyen al metabolismo del gluten in vivo. La colonización de ratones libres de bacterias con cepas degradadoras de gluten aisladas del duodeno reduce la cantidad de gluten en el intestino, con respecto a ratones no colonizados, tras la ingestión de una cantidad determinada de gluten dietético. Este resultado fue relacionado con la capacidad hidrolítica de los contenidos intestinales con respecto al gluten ex vivo. Además, la escisión de los péptidos del gluten a nivel molecular es diferente entre bacterias. *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista perteneciente al grupo Proteobacteria y aislado de muestras duodenales de pacientes celíacos, es capaz de degradar el péptido recalcitrante 33-mer generando péptidos de unos 15-22 aminoácidos. Estos péptidos mantenían las secuencias inmunogénicas de su predecesor y fueron capaces de estimular células T dependientes del gluten aisladas del suero de pacientes celíacos. Estos péptidos inmunogénicos producidos por *Pseudomonas* pueden ser degradados por miembros habituales de la microbiota duodenal, como son los *Lactobacillus*, reduciendo considerablemente su toxicidad. A su vez, nuestro grupo llevó a cabo incubaciones más complejas con *Pseudomonas* del duodeno de celíacos, o *Lactobacillus* aislados de muestras duodenales de voluntarios sanos, con gluten digerido previamente con pepsina y tripsina. Nuestros resultados mostraron que los péptidos producidos por *Pseudomonas* son altamente inmunogénicos para las células T dependientes del gluten aisladas de pacientes celíacos. Curiosamente, el menor tamaño de estos péptidos permite una mayor difusión desde el lumen a la lámina propia, donde se desencadena la respuesta inmune, incrementando su carácter tóxico. Por el contrario, los *Lactobacillus* generaron péptidos poco reactivos. Por lo tanto, nuestros trabajos sugieren que las bacterias intestinales desempeñan un papel importante en el metabolismo del gluten, incrementando o reduciendo su inmunogenicidad. Estas interacciones entre gluten, microbios y hospedador pueden modular el riesgo de presentar EC en pacientes con una susceptibilidad genética¹⁵.

La microbiota intestinal en el tratamiento de la enfermedad celíaca

El control de la microbiota intestinal se ha propuesto como un posible tratamiento complementario a la dieta sin gluten. Varios estudios han expuesto los efectos beneficiosos que algunas de nuestras bacterias pueden ejercer sobre la EC. Por ejemplo, se ha mostrado que cepas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* aisladas de muestras fecales de voluntarios sanos tienen efectos inmunomoduladores frente al gluten tanto in vivo como in vitro. Varios probióticos (como *Bifidobacterium infantis* NLS, *Bifidobacterium longum* CECT o VSL#3) han mostrado resultados prometedores aunque los datos no son concluyentes, y no permiten dar indicaciones terapéuticas claras por el momento¹⁶⁻¹⁸. Nuestros trabajos abren la posibilidad al uso de bacterias co-mensales con la habilidad de degradar los péptidos inmunogénicos del gluten. El uso de proteasas microbianas como

terapia enzimática (farmacológica) oral, la cual se basa en la reducción de péptidos de gluten antes de llegar al intestino delgado, lleva estudiándose durante más de una década en EC. Varias enzimas con la capacidad de degradar el gluten eficientemente como AN-PEP, ALV003 o STAN1 han sido propuestas¹⁹⁻²¹. Sin embargo, la mayoría de estas enzimas provienen de microorganismos ambientales que no residen en el tracto digestivo, reduciendo sus posibilidades en el tratamiento de la EC, además de ser problemática la elección de una dosis adecuada para mantener activas las enzimas durante el proceso de digestión. La formación de una microbiota intestinal que pueda estimular una respuesta inmune tolerogénica al gluten, ya sea mediante la estimulación del sistema inmune como a través de la degradación de las regiones inmunes de este, puede ser de interés en el futuro.

Conclusiones

Cada vez surge más evidencia científica para sostener un rol de la microbiota intestinal en la EC. La microbiota intestinal tiene un papel dual en la EC, incrementando o reduciendo la susceptibilidad de un individuo al gluten. Los microbios de nuestro intestino pueden interactuar directamente con el sistema inmune, activando una respuesta tanto proinflamatoria como tolerogénica al gluten dietético. Además, dicha microbiota puede metabolizar el gluten dietético en el intestino, modificando su inmunogenicidad. El control de la microbiota intestinal puede abrir las puertas a tratamientos innovadores en la EC.

Bibliografía

1. Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:497-506.
2. Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, Laass M, Ney D, et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics*. 2010; 125:e1433-40.
3. Mårdild K, Kahrs CR, Tapia G, Stene LC, Størdal K. Infections and risk of celiac disease in childhood: a prospective nationwide cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2015;110:1475-84.
4. Lebwohl B, Spechler SJ, Wang TC, Green PH, Ludvigsson JF. Use of proton pump inhibitors and subsequent risk of celiac disease. *Dig Liver Dis*. 2014;46:36-40.
5. Sanz Y, De Pama G, Laparra M. Unraveling the ties between celiac disease and intestinal microbiota. *Int Rev Immunol*. 2011;30:207-18.
6. Galipeau HJ, McCarville JL, Huebener S, Litwin O, Meisel M, Jabri B, et al. Intestinal microbiota modulates gluten-induced immunopathology in humanized mice. *Am J Pathol*. 2015;185: 2969-82.
7. Corouge M, Loridant S, Fradin C, Salleron J, Damiens S, Mora-gues MD, et al. Humoral immunity links *Candida albicans* infection and celiac disease. *PLoS One*. 2015;10:e0121776.
8. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:2333-40.
9. D'Argenio V, Casaburi G, Precone V, Pagliuca C, Colicchio R, Sarnataro D, et al. Metagenomics reveals dysbiosis and a potentially pathogenic *N. flavescent* Strain in duodenum of adult celiac patients. *Am J Gastroenterol*. 2016;111:879-90.
10. Rubio-Tapia A, Barton SH, Rosenblatt JE, Murray JA. Prevalence of small intestine bacterial overgrowth diagnosed by quantitative culture of intestinal aspirate in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43:157-61.
11. Sánchez E, Nadal I, Donat E, Ribes-Koninkx C, Calabuig M, Sanz Y. Reduced diversity and increased virulence-gene carriage in intestinal enterobacteria of coeliac children. *BMC Gastroenterol*. 2008;8:50.
12. Galipeau HJ, Caminero A, Bernier SP, et al. Proteolytic bacteria promote immune activation and gluten-induced pathology in mice. *Mucosal Immunology Course and Symposium (MICS)*, 2016.
13. 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.
14. 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.
15. Caminero A, Galipeau HJ, McCarville JL, Johnston CW, Bernier SP, Russell AK, et al. Duodenal bacteria from patients with celiac disease and healthy subjects distinctly affect gluten breakdown and immunogenicity. *Gastroenterology*. 2016;151: 670-83.
16. Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y. 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*. 2014;112:30-40.
17. Smecoul E, Hwang HJ, Sugai E, Corso L, Cherñavsky AC, Bellavite FP, et al. Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of *Bifidobacterium infantis* natren life start strain super strain in active celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47:139-47.
18. De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, et al. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue and gluten intolerance. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762:80-93.
19. Lähdeaho ML, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova OP, Kärjä-Lahdensuu T, et al. Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology*. 2014;146:1649-58.
20. Tack GJ, Van de Water JM, Bruins MJ, Kooy-Winkelhaar EM, Van Bergen J, Bonnet P, et al. Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: a pilot-study. *World J Gastroenterol*. 2013;19:5837-47.
21. McCarville JL, Caminero A, Verdu EF. Pharmacological approaches in celiac disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;25:7-12.