



Universidad de Valladolid

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

Trabajo de Fin de Grado

**Terapia enzimática y probióticos: nuevas estrategias
para la hidrólisis del gluten en el intestino**

**Enzymatic therapy and probiotics: new strategies for
the hydrolysis of gluten in the gut**

Alumno: Michel Antunes Silván

Tutor: Eduardo Arranz Sanz

Valladolid, 18 de Junio de 2018

RESUMEN

La enfermedad celiaca es un proceso multiorgánico crónico, para el cual actualmente sólo existe un tratamiento: la dieta sin gluten estricta. Los humanos no tenemos todos los enzimas necesarios para la digestión del gluten, sino que nos faltan proliil endopeptidasas (PEP), un tipo de enzimas que actúan sobre proteínas con alto contenido en prolina. Además, se han observado alteraciones en la microbiota intestinal de pacientes con enfermedad celiaca y desequilibrios en los componentes de la misma, comparados con sujetos no celíacos.

Por esto, es interesante la búsqueda de nuevas terapias complementarias a la dieta sin gluten, como son la terapia enzimática oral con peptidasas para la digestión del gluten o la administración de probióticos con el objetivo de restaurar la microbiota intestinal. También se hace referencia a nuevas técnicas de modificación del gluten en las harinas, que tienen como fin la creación de productos con menor cantidad de gluten, aumentando así la seguridad para los pacientes con enfermedad celiaca. Estas técnicas podrían ser de ayuda como complemento a la dieta sin gluten, ya sea debido a transgresiones dietéticas o al consumo accidental de gluten.

ABSTRACT

Celiac disease is a chronic multi-organ process, for which there is currently only one treatment: strict gluten-free diet. Humans do not have all the enzymes necessary for the digestion of gluten, but we lack the prolyl endopeptidases (PEP), a type of enzymes that act on proteins with high proline content. In addition, alterations in the gut microbiota of patients with celiac disease and imbalances in the components of the same have been observed, compared with non-celiac subjects.

For this reason, the search for new complementary therapies to the gluten-free diet is interesting, such as oral enzymatic therapy with peptidases for the digestion of gluten or the administration of probiotics with the aim of restoring the gut microbiota. Reference is also made to new techniques for modifying gluten in flours, which aim to create products with a lower amount of gluten and increasing safety for patients with celiac disease. These techniques can be used as a complement to the gluten-free diet, either due to dietary transgressions or to the accidental consumption of gluten.

Palabras clave - Microbiota intestinal y gluten. Degradación del gluten. Prolil endopeptidasas y gluten. Peptidasas y gluten. Hidrólisis del gluten. Probióticos y gluten.

Keywords - Gut microbiota and gluten. Gluten degradation. Prolyl endopeptidases and gluten. Peptidases and gluten. Hydrolysis of gluten. Probiotics and gluten.

ABREVIATURAS (por orden de aparición)

- PEP: prolil endopeptidasa.
- HLA: sistema del antígeno leucocitario humano.
- DQ2/DQ8: alelos en enfermedad celiaca.
- TGt: enzima transglutaminasa tisular.
- CD4⁺: cuádruple cúmulo de diferenciación, molécula expresada en la superficie de algunas células T y células dendríticas.
- IL-15: interleucina-15.
- NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, complejo proteico que controla la transcripción del ADN.
- iNOS: enzima óxido nítrico sintasa.
- AGCC: ácidos grasos de cadena corta.
- NDC: carbohidratos no digeribles.
- GLP-2: péptido similar al glucagón-2.
- NDN: nutrientes no digeribles.
- LIE: linfocitos intraepiteliales.
- AN-PEP: prolil endopeptidasa de *Aspergillus niger*.
- TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa.
- Mx-PEP: prolil endopeptidasa de *Mixococcus xanthus*.
- mTG: enzima transglutaminasa microbiana.
- BAL: bacterias ácido-lácticas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Gluten y enfermedad celiaca	1
1.1.1. Proteínas del gluten.....	1
1.1.2. Mecanismo de digestión del gluten y respuesta inmunitaria específica....	2
1.1.3. Toxicidad directa del gluten	3
1.2. Microbiota intestinal.....	3
1.2.1. Conceptos	3
1.2.2. Composición de la microbiota.....	4
1.2.3. Microbiota en enfermedades relativas al tracto digestivo	5
1.2.4. Factores que influyen en la integridad y composición de la microbiota	5
1.2.5. Microbiota y digestión del gluten.....	8
1.3. Justificación y objetivos	9
2. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Estudios realizados en animales.....	12
3.2. Estudios realizados en humanos	13
3.2.1. Peptidasas procedentes de plantas	13
3.2.2. Peptidasas procedentes de hongos.....	15
3.2.3. Peptidasas procedentes de bacterias	19
3.2.4. Peptidasas procedentes de insectos	21
3.2.5. Peptidasas producidas mediante ingeniería	21

3.2.6.	Probióticos: restauración de la microbiota normal.....	22
3.3.	Modificación de la toxicidad del gluten en harinas	24
3.3.1.	Modificación de la estructura del gluten mediante enzimas	24
3.3.2.	Modificación de la estructura del gluten mediante el horneado.....	24
3.3.3.	Modificación de la estructura del gluten mediante aditivos.....	25
3.3.4.	Modificación de la estructura del gluten mediante BAL.....	25
3.4.	Utilidad terapéutica	25
3.5.	Otros tratamientos no dietéticos en fase de estudio.....	27
4.	CONCLUSIONES.....	29
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	30
6.	ANEXOS.....	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Gluten y enfermedad celiaca

1.1.1. Proteínas del gluten

La enfermedad celiaca es un trastorno multiorgánico mediado por el sistema inmunitario, que se desencadena por el gluten en personas genéticamente predispuestas, con aparición a cualquier edad y distribución mundial. Es una de las patologías más desafiantes, y contra la cual no hay agentes farmacológicos disponibles aún (1). Con una prevalencia de alrededor del 1%, tiene un componente genético fuerte: aproximadamente el 95% de pacientes poseen el HLA-DQ2, siendo el resto HLA-DQ8. Esta asociación se explica a través de la observación de que las células T específicas para los péptidos de gluten reconocen antígenos en el contexto de moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8, encontradas en pacientes celíacos (2). En la enfermedad celiaca hay una pérdida de tolerancia frente al gluten y proteínas similares.

El gluten es una proteína que está presente en los cereales trigo, cebada, centeno y avena, y también en sus derivados, como kamut, espelta o triticale. En el trigo, las proteínas del endosperma son mezclas complejas que, de acuerdo a su solubilidad, se dividen en cuatro fracciones: albuminas (solubles en agua); globulinas (solubles en soluciones salinas); gliadinas (solubles en etanol) y gluteninas (solubles bajo condiciones más agresivas, a ácidos, agentes reductores, detergentes, urea, etc.).

Las gliadinas (que se encuentran en forma de monómeros) y las gluteninas (que se encuentran en forma de polímeros), y sus homólogos en cebada y centeno, reciben el nombre de prolaminas, debido a su elevado contenido de los aminoácidos prolina y glutamina que, junto a la fenilalanina representan el 60-80% de la composición aminoacídica. Ambas son proteínas de almacenamiento y comprenden casi la mitad del contenido de proteínas de la harina de trigo. Las gliadinas, a su vez, han sido clasificadas en α -, β -, γ - y ω - gliadinas, basándose en su movilidad electroforética en condiciones de pH ácido. Las prolaminas de la cebada se denominan hordeínas, y las del centeno, secalinas. (3)

1.1.2. Mecanismo de digestión del gluten y respuesta inmunitaria específica

En condiciones normales, los péptidos proteicos son hidrolizados en la luz del intestino, dando lugar a otros más pequeños o a aminoácidos aislados mediante peptidasas gástricas, pancreáticas y del borde en cepillo intestinal antes del transporte transepitelial a la lámina propia mucosa.

Los humanos no poseemos todos los enzimas necesarios para la digestión del gluten. Existe una familia de peptidasas, denominadas prolil endopeptidasas (PEP), que actúan sobre proteínas con alto contenido en prolina. Por esto, actúan sobre las prolaminas del gluten, dividiéndolo en fragmentos más pequeños con el objetivo de reducir su toxicidad. La digestión intraluminal incompleta del gluten origina fragmentos residuales, como el de la posición 57-75 de la α -gliadina, resistente a la proteólisis enzimática debido a su contenido en glutamina y prolina.

Cuando el gluten atraviesa la barrera epitelial del intestino hasta llegar a la lámina propia mucosa, se puede convertir en diana de la enzima transglutaminasa tisular (TGt), enzima importante para la cicatrización de heridas, la regeneración de tejidos, etc. Cuando hay exceso de gluten, la TGt induce modificaciones puntuales en la conformación de los aminoácidos contenidos en las proteínas. Como consecuencia de la acción de esta enzima, algunos residuos de glutamina se convierten en ácido glutámico, lo que provoca que esta proteína se convierta en inmunogénica (el sistema inmunitario la reconoce como algo extraño al cuerpo). Esta modificación aumenta la afinidad por las moléculas HLA en células presentadoras de antígeno, y con ello su presentación a los linfocitos T reactivos al gluten, y posterior activación de células B productoras de anticuerpos. Los linfocitos T ($CD4^+$) reconocen péptidos tóxicos de la gliadina, como el 33-mer (fragmento 56-88 de la α -gliadina). Se pone en marcha una respuesta mediada por la producción de citoquinas proinflamatorias, que conducen a la destrucción del epitelio y la superficie de absorción de nutrientes. Algunas consecuencias derivadas de esto son la hipersensibilidad retardada, los fenómenos autoinmunes y las alteraciones en la matriz extracelular y en la proliferación epitelial.

1.1.3. Toxicidad directa del gluten

Recientemente, mediante estudios *ex vivo* utilizando piezas de biopsia intestinal activadas con péptidos de gliadinas, se ha observado que algunos péptidos (en particular el p31-43 de la α -gliadina) desencadenan una serie de mecanismos que no están asociados con la respuesta específica, donde interviene tanto el epitelio como los elementos responsables de la inmunidad innata. (3)

La gliadina es capaz de debilitar las uniones estrechas localizadas entre las células del epitelio intestinal, denominadas *tight junctions*, con lo que aumenta la permeabilidad intestinal y se produce el paso del gluten a la lámina propia mucosa. En la enfermedad celiaca activa se ha observado un aumento en el transporte a través del epitelio de fragmentos tóxicos e inmunogénicos.

Algunos péptidos, como el péptido 19-mer de la gliadina (tóxico), inducen una respuesta inmunológica innata que se caracteriza por la presencia de la citoquina IL-15 (inflamatoria), producida por los enterocitos. Ésta a su vez activa al NF- κ B en las células adyacentes, aumentando la producción de IL-15 (induce citotoxicidad y apoptosis celular) y la inducción de iNOS, responsables de una situación de estrés oxidativo y una retroalimentación de la respuesta innata.

1.2. Microbiota intestinal

1.2.1. Conceptos

La microbiota intestinal ha coevolucionado con nosotros siguiendo una estrecha relación de simbiosis, y su importante papel ha sido demostrado en estudios con animales, siendo sus principales funciones las de barrera defensiva contra la colonización por patógenos, funciones metabólicas como proveedor de enzimas o regulación y desarrollo del sistema inmunitario. (4)

Algunos conceptos a destacar son:

- Microbiota: es una comunidad microbiana que incluye bacterias, el género *archaea*, eucariotas y virus, ocupando un hábitat determinado.

- Microbioma: es la totalidad de la comunidad microbiana, junto con sus genomas y las interacciones medioambientales que tienen lugar entre los individuos.

A nivel bacteriano se ha descrito que un desequilibrio en las concentraciones de los distintos componentes que conforman la microbiota intestinal, denominado disbiosis, podría participar en la aparición de la enfermedad celiaca. (5)

1.2.2. Composición de la microbiota

Se han observado diferencias en los microorganismos presentes en los pacientes celiacos, en comparación con la microbiota de los individuos sanos. (Modificado de (1))

Microorganismo/s más abundantes en sujetos celiacos	Microorganismos más abundantes en sujetos sanos
<i>Prevotella, Actinomyces spp, Bacteroides, Clostridium</i> <i>Bacteroides vulgatus, Escherichia coli</i> <i>Bacteroides spp, Staphylococcus spp, Salmonella spp, Shigella spp, Klebsiella spp</i> <i>Klebsiella oxytoca, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus pasteurii</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Neisseria spp, Proteobacteria</i>	<i>Lactobacillus spp, Enterococcus spp, Bifidobacteria spp</i> <i>Streptococcus anginosus, Streptococcus mutans</i> <i>Actinomyces spp, Atopobium spp, Corynebacterium durum</i>

Tabla 1. Especies bacterianas frecuentemente aisladas en pacientes celiacos. (Modificado de (1))

Se han descrito también diferencias en la distribución de los microorganismos y su abundancia relativa en distintas zonas corporales: (6)

Hábitat microbiano	Filos más representados y abundancia relativa (%)	Número de especies
Cavidad oral	<i>Firmicutes</i> (36.7), <i>Bacteroidetes</i> (17.3), <i>Proteobacteria</i> (17.1), <i>Actinobacteria</i> (11.9), <i>Fusobacteria</i> (5.2)	>500
Piel	<i>Actinobacteria</i> (52), <i>Firmicutes</i> (24.4), <i>Proteobacteria</i> (16.5), <i>Bacteroidetes</i> (6.3)	~300
Vías aéreas	<i>Actinobacteria</i> (55), <i>Firmicutes</i> (15), <i>Proteobacteria</i> (8), <i>Bacteroidetes</i> (3)	>500
Intestino	<i>Firmicutes</i> (38.8), <i>Bacteroidetes</i> (27.8), <i>Actinobacteria</i> (8.2), <i>Proteobacteria</i> (2.1)	>1000
Tracto urogenital (principalmente mujeres)	<i>Firmicutes</i> (83), <i>Bacteroidetes</i> (3), <i>Actinobacteria</i> (3)	~150

Tabla 2. Composición de la microbiota humana en las cinco regiones corporales más extensivamente estudiadas. (Obtenido de (6))

1.2.3. Microbiota en enfermedades relativas al tracto digestivo

También se han observado cambios en la microbiota asociados a enfermedades gastrointestinales, como en el caso de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa): (Modificado de (4))

Cambios en la composición y función microbiana	
Aumento	Disminución
<i>Gammaproteobacteria</i>	α -Diversidad
Auxotrofia	<i>Bacteroides</i> y <i>Firmicutes</i>
Transporte de aminoácidos	<i>Clostridia</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Transporte de sulfatos	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Estrés oxidativo	AGCC, butirato
Secreción de toxinas	Metabolismo butanoato y propanoato
	Biosíntesis de aminoácidos
Presencia de <i>E. coli</i> (específicamente adherente-invasivo) y <i>Fusobacterium</i>	

Tabla 3. Cambios en la microbiota asociados a Enfermedad Inflamatoria Intestinal. (Modificado de (4))

Por ejemplo, se ha establecido la presencia de *Enterobacteria* en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (*Escherichia coli* y *Shigella*), mientras que en la mucosa del colon de los pacientes con colitis ulcerosa se han observado altas concentraciones de *Fusobacterium*. (7)

1.2.4. Factores que influyen en la integridad y composición de la microbiota

Entre los factores que pueden alterar la microbiota, se citan los siguientes: (8)

- Edad

El desarrollo de la microbiota humana es un proceso dinámico, y la microbiota es establecida en el nacimiento. Inicialmente, dominan los microorganismos facultativos anaerobios (*Enterobacteriaceae*, *Streptococci*, *Staphylococci*).

En bebés nacidos por vía vaginal, la colonización es iniciada por la microbiota intestinal y vaginal, así como por el entorno. Por otro lado, en bebés nacidos por cesárea, el entorno es una fuente extremadamente importante de bacterias colonizadoras, y estos bebés tienen un recuento bacteriano y una diversidad más baja en las semanas tempranas de la vida.

La composición de la microbiota cambia con la introducción de alimentos sólidos, y la composición similar a la adulta es establecida a partir de los 2-3 años de edad. Durante la edad adulta, la composición de la microbiota es relativamente estable y sólo se ve alterada por la presencia de factores externos.

Sin embargo, esta estabilidad disminuye en la vejez, donde también se ve reducida la diversidad microbiana.

- Dieta

Es un factor determinante en la composición de la microbiota intestinal. La dieta provee nutrientes a la microbiota en el tracto gastrointestinal. Los cambios en la composición de la microbiota intestinal en respuesta a la ingestión de alimentos son debidos a que diferentes especies bacterianas están mejor equipadas genéticamente que otras para utilizar diferentes sustratos. Generalmente, las bacterias favorecen a los carbohidratos como fuente principal de energía si éstos se encuentran disponibles.

Se han demostrado cambios rápidos y reversibles en la abundancia relativa de grupos bacterianos dominantes específicos tras cambios producidos en los carbohidratos no digeribles (NDC).

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son fuente de energía para el epitelio del colon, y en especial el butirato tiene efectos importantes en la diferenciación celular y la salud intestinal.

El vegetarianismo también ha demostrado alterar la composición de la microbiota. La ingestión de carbohidratos y fibra produce grandes cantidades de AGCC, que tiene como consecuencia una reducción en el pH intestinal, previniendo el crecimiento de bacterias potencialmente patogénicas, como *Escherichia coli* y algunos miembros de *Enterobacteriaceae spp.*

Basándose en todos los datos disponibles, las diferencias en las composiciones de la microbiota intestinal son demostrables entre grupos de población siguiendo dietas diferentes.

- Uso de antibióticos

El tratamiento con antibióticos ha demostrado producir un cambio dramático en la composición de la microbiota fecal en humanos.

Se han descrito casos de cambios en la densidad o en la composición de la microbiota intestinal de niños que seguían tratamiento con antibióticos. De forma general, el tratamiento con antibióticos conduce a una disminución en la diversidad microbiana. Este desequilibrio en la microbiota puede afectar también a la actividad metabólica de la comunidad bacteriana en el intestino.

El tratamiento con antibióticos en pacientes hospitalizados ha producido un incremento en la abundancia de bacterias proteolíticas en el intestino, lo que reduce el recuento total bacteriano y, en algunos sujetos, elimina por completo algunas comunidades bacterianas. Una de las complicaciones más conocidas es la diarrea asociada a antibióticos. Se caracteriza por un crecimiento patológico de *Clostridium difficile*, y provoca un desequilibrio en el metabolismo de los carbohidratos, ocasionando una malabsorción de partículas osmóticamente activas. A esto también le sigue una disminución en la prevalencia de bacterias productoras de butirato.

- Presencia de enfermedades gastrointestinales

En el caso de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, se ha observado una disminución de la diversidad microbiana y de la estabilidad de la microbiota intestinal. Además, se han encontrado cantidades aumentadas de *Escherichia coli* (de la cual hay cepas que pueden ser patogénicas) y una detección aumentada de *Clostridium difficile* en la recaída y la remisión de ambas formas de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa).

Por otro lado, en el Síndrome de Intestino Irritable se produce una mala fermentación de los alimentos, una alteración en la composición microbiana y una disfunción intestinal motora y sensorial. Se ha detectado un aumento de miembros no clasificados de *Enterobacteriaceae* y una reducción en miembros del género *Faecalibacterium* en pacientes con Síndrome de Intestino Irritable comparados con sujetos sanos.

Con referencia a la obesidad, estudios en animales han demostrado la influencia de la microbiota intestinal en la regulación del contenido graso. Se han observado cambios en la composición de la microbiota en casos de obesidad y diabetes tipo 2.

Estas enfermedades están generalmente asociadas a una inflamación crónica de bajo grado. En sujetos obesos, el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* está aumentado.

Este ratio es un indicador del equilibrio general de la microbiota intestinal, y por ello conviene que no esté demasiado aumentado ni disminuido.

También se ha señalado la importancia de otros factores ambientales (tales como los patrones de lactancia materna, las infecciones microbianas o las alteraciones de la microbiota intestinal (disbiosis)) a tener en cuenta en el establecimiento de la integridad microbiana del intestino. Se han descrito disbiosis en pacientes celíacos caracterizadas por un incremento del grupo *Proteobacteria*. (5)

1.2.5. Microbiota y digestión del gluten

Las proteínas del gluten presentan una toxicidad que depende, en gran medida, de las regiones aminoacídicas ricas en glutamina y prolina, las cuales confieren resistencia a las enzimas digestivas humanas. Por ello aparecen péptidos que desencadenan una respuesta inmunitaria característica de la celiaquía, como el 33-mer. (5)

En estudios realizados en animales se ha observado que las bacterias intestinales contribuyen al metabolismo del gluten *in vivo*, relacionando estos resultados con la capacidad de hidrólisis del contenido intestinal con respecto al gluten *ex vivo*. Patógenos oportunistas pertenecientes a *Proteobacteria*, como *Pseudomonas aeruginosa*, mantienen las secuencias inmunogénicas del péptido 33-mer tras su degradación. Sin embargo, estas secuencias pueden ser degradadas por *Lactobacillus*, miembros habituales de la microbiota duodenal, reduciendo así su toxicidad.

Además, comparando los péptidos producidos por los microorganismos anteriores, se observó que *Pseudomonas* produce péptidos altamente inmunogénicos para las células T dependientes del gluten aisladas de pacientes celíacos. El reducido tamaño de estos péptidos permite una mayor difusión lumen-lámina propia, donde se desencadena la respuesta inmunitaria, incrementando su toxicidad. Por otro lado, los péptidos generados por *Lactobacillus* resultaron ser poco reactivos. Por todo esto, se establece que las bacterias intestinales tienen un papel importante en el metabolismo del gluten, incrementando o reduciendo su inmunogenicidad.

En la enfermedad celíaca, el único tratamiento completamente eficaz es la dieta sin gluten.

Para conseguir una dieta exenta de gluten, hay que excluir de la dieta el trigo; es decir, todas las especies *Triticum*, tales como trigo duro, trigo espelta y trigo khorosan; el triticale (un cereal obtenido por el cruce de trigo y centeno), la cebada, el centeno o sus variedades híbridas y productos derivados.

En cuanto a la avena, la mayoría de personas celiacas pueden incluirla en su alimentación sin que provoque efectos nocivos, pero se debe tener en cuenta el riesgo de que la avena se contamine con trigo, centeno o cebada durante el transporte, almacenamiento y tratamiento de los cereales.

1.3. Justificación y objetivos

En los últimos años, el porcentaje de población intolerante al gluten o que sospecha serlo, ha sufrido un incremento drástico. La enfermedad celiaca en la actualidad es un desorden que puede afectar a un porcentaje estimado del 1% de la población, y el único tratamiento disponible hasta el momento es el seguimiento de una dieta sin gluten estricta.

La microbiota y los probióticos, tema en el cual se profundiza en esta revisión, es parte fundamental de esta enfermedad, al confirmarse su implicación en el metabolismo del gluten en el intestino.

Además de esto, también son parte fundamental las peptidasas o proteasas, que hidrolizan el gluten hasta convertirlo en fragmentos muy pequeños, reduciendo su inmunogenicidad y convirtiéndolos en péptidos más tolerables. En cuanto a las peptidasas, los humanos no poseemos todos los enzimas necesarios para la completa digestión del gluten, ya que no tenemos PEP (enzimas que actúan sobre proteínas con alto contenido en prolina).

Se han identificado enzimas con eficacia en la degradación del gluten. La utilización de enzimas como terapia oral puede tener valor terapéutico, que depende de su resistencia a la degradación por otras enzimas gastrointestinales y de su eficiencia en el entorno en el cual se producen péptidos tóxicos.

Se establece también que estas enzimas deben ser activas a pH ácido, y capaces de acceder a una composición de gluten obstaculizada por otros componentes como el cocinado o el horneado.

Por otra parte, se han descrito cambios en la microbiota en individuos celíacos con respecto a la microbiota en individuos sanos, produciéndose un desequilibrio en la proporción de microorganismos presentes en la microbiota de individuos celíacos.

Por estas razones, esta revisión bibliográfica ha sido realizada con el objetivo principal de buscar alternativas complementarias a la dieta sin gluten en pacientes celíacos, como la terapia oral enzimática con peptidasas y los probióticos, para ayudar a la hidrólisis del gluten en el tracto gastrointestinal.

El objetivo secundario del presente trabajo es buscar evidencias sobre alternativas centradas en la modificación de la estructura del gluten, con el fin de proporcionar productos lo más aptos posibles para pacientes con intolerancia al gluten.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En esta revisión bibliográfica, realizada en la base de datos Pubmed y en Google Scholar, se ha recopilado un total de 57 artículos, de los cuales han sido descartados 17, al no cumplir alguno de los criterios de inclusión. Además, se han revisado algunos capítulos del libro “Enfermedad celiaca” para confirmar los conceptos más relevantes de esta enfermedad. (3) (9)

Las palabras clave utilizadas en la búsqueda han sido: gut microbiota and gluten, gluten degradation, prolyl endopeptidases and gluten, peptidases and gluten, hydrolysis of gluten, probiotics and gluten.

Para la búsqueda de información, se ha seguido el esquema denominado “estrategia PICO”, en relación con la medicina basada en la evidencia:

P – Definición del **p**roblema o **p**aciente, que en este caso sería enfermedad celiaca o pacientes celíacos, cuyo tratamiento se basa en la dieta sin gluten.

I – Intervención que queremos analizar, centrada en la terapia complementaria basada en enzimas y probióticos, así como las técnicas que puedan llegar a conseguir alimentos más seguros para los pacientes celíacos.

C – Intervención de **c**omparación, relacionando las nuevas terapias propuestas (basadas en la dieta) con otros tratamientos de tipo farmacológico (no basados en la dieta), como complemento a la dieta sin gluten.

O – **O**utcomes o resultados, que son todos los que se describen en relación a las intervenciones anteriormente mencionadas.

- Criterios de inclusión:
 - Estudios en idioma inglés.
 - Estudios recientes, publicados en los últimos 5 años.
 - Estudios en humanos, ya que es difícil extrapolar resultados de una población (animales) a otra (humanos).
- Criterios de exclusión:
 - Todo lo que no cumpliera con los criterios anteriormente mencionados.

3. RESULTADOS

Se ha establecido una división entre estudios realizados en animales y estudios realizados en humanos, debido al sesgo que se produce al extrapolar resultados de una población a otra (siendo los estudios en humanos uno de los criterios de inclusión establecidos).

3.1. Estudios realizados en animales

En el trabajo de Geurts et al. (10) se ha estudiado la microbiota y su relación con el grado de inflamación. En la segunda parte de la revisión, se ha estudiado el péptido GLP-2, producido por células L y con un papel fundamental en la integridad de la barrera intestinal y en el control de la proliferación de las células epiteliales. La producción endógena aumentada de este péptido se ha asociado con la restauración de las *tight junctions* o 'uniones estrechas' entre células del epitelio intestinal, y con la expresión y distribución proteica en éstas. Posteriormente, se ha observado el efecto de los NDN en la fisiopatología relacionada con la obesidad: este efecto ha reflejado una reducción en la glucemia, masa grasa, esteatosis, apetito, lipemia, resistencia a la insulina, inflamación y endotoxemia metabólica, además de un aumento en la tolerancia a la glucosa.

Caminero et al. (11) han estudiado la hidrólisis y digestión del gluten, observándose que *Lactobacillus spp.* es capaz de degradar péptidos de gluten, disminuyendo su potencial inmunogénico. *Lactobacillus spp.* ha mostrado un metabolismo del gluten rápido y efectivo, y es capaz de detoxificar péptidos de gliadina después de una digestión parcial por proteasas humanas.

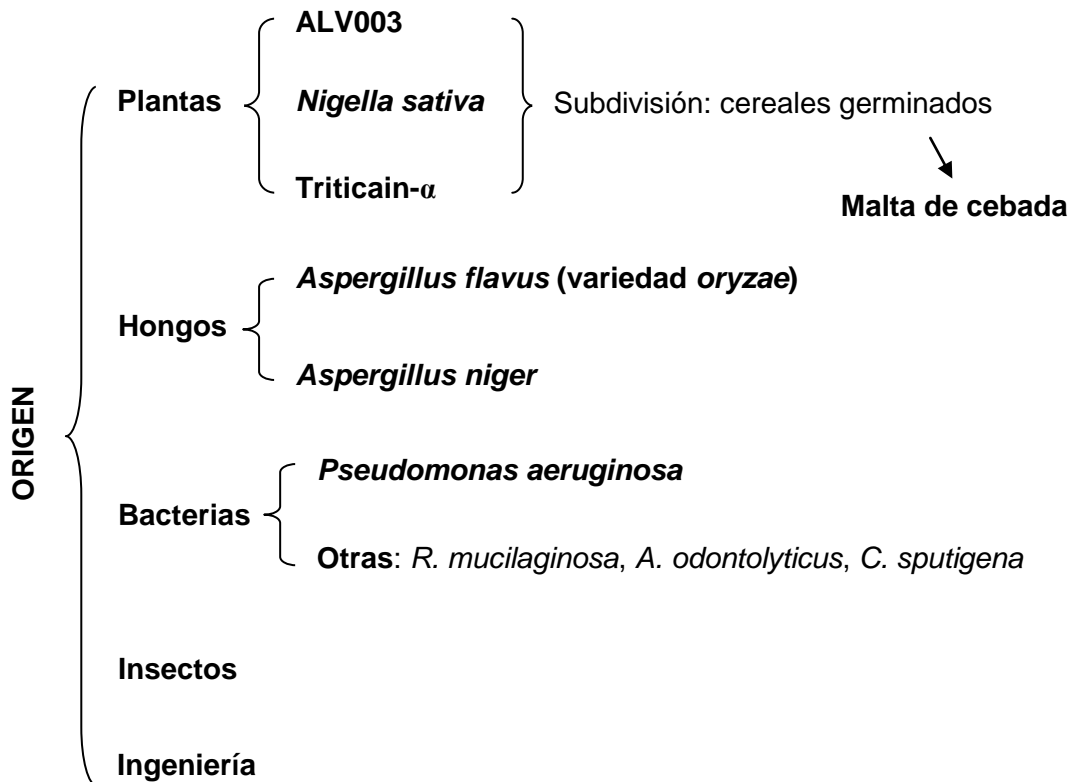
Además, Caminero et al. (5) han observado que *Lactobacillus spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* poseen papeles antagónicos. Esta última tiene una inmunogenicidad muy alta, producida al traslocar péptidos a través de la mucosa. Por el contrario, *Lactobacillus spp.* es capaz de degradar los productos hasta conseguir un potencial inmunogénico bajo.

En el estudio de Luongo et al. (12) se utilizaron ratones omnívoros, vegetarianos y veganos con el fin de observar los cambios producidos en la microbiota de los mismos, se examinaron muestras fecales aisladas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Se han identificado diferencias específicas por género en la actividad inmunomoduladora de las células dendríticas de los ratones, y se ha encontrado también asociación entre las características inmunológicas cruciales de las poblaciones bacterianas y los hábitos dietéticos específicos. Por último, el área geográfica reflejó un impacto significativo en el potencial antiinflamatorio de los miembros de esos géneros bacterianos.

3.2. Estudios realizados en humanos

Las peptidasas que metabolizan gluten han sido divididas de acuerdo a su origen: (13)



3.2.1. Peptidasas procedentes de plantas

Una de las peptidasas más estudiadas ha sido ALV003, una mezcla de dos proteasas específicas de gluten administradas de forma oral. En especial, se ha observado su capacidad para proteger a los pacientes celíacos del daño en la mucosa inducido por el gluten (ensayo en fase 2).

Esta combinación de enzimas es capaz de atenuar el daño producido por el gluten al modificar la morfometría de las criptas y las densidades de los LIE. Ensayos clínicos y no clínicos demuestran que ALV003 es capaz de degradar las proteínas del gluten convirtiéndolas en fragmentos peptídicos no inmunogénicos.

Este es el primer agente farmacológico en el que se ha demostrado la capacidad de degradar péptidos de gluten, disminuyendo su inmunogenicidad y el daño en la mucosa intestinal en sujetos celíacos. Poner en el punto de mira péptidos de gluten ricos en prolina y glutamina, y su posible modificación mediante enzimas, es un avance potencialmente viable en el tratamiento de la enfermedad celíaca. (14)

Además de la anterior, Bellir et al. (15) han observado otras proteasas con capacidad de digestión de gluten, obtenidas de las semillas de la planta *Nigella sativa*. El pH óptimo para la actividad peptidasa de la misma fue de 1.5, la temperatura óptima fue de 50 °C y la actividad más alta fue registrada tras 90 minutos de incubación.

Se concluyó que la enzima proteolítica parcialmente purificada por las semillas de *Nigella sativa* es capaz de hidrolizar la proteína completa, por lo que podría ser de utilidad.

Savvateeva et al. (16) han estudiado la actividad glutenasa y colagenasa de una proteasa específica para la cisteína de trigo, denominada Triticain- α . El gluten de trigo fue incubado con Triticain- α -GM durante 5 minutos en medios ácidos, neutros y ligeramente alcalinos, a varias temperaturas.

Se observó que Triticain- α -GM cataliza de forma efectiva la degradación del gluten a pH 3.6, 5.6 o 6.5, y temperaturas entre 4 °C y 45 °C. La digestión completa fue observada a pH ácido a 45 °C, aunque a 37 °C la reacción fue casi eficiente.

Los autores demostraron significativamente que Triticain- α -GM posee actividad glutenasa y colagenasa a 37 °C. Para su posible aplicación futura, es importante el hecho de que Triticain- α demostró ser relativamente estable a la proteólisis mediada por pepsina.

También han sido estudiadas las peptidasas procedentes de cereales germinados. En el trabajo de Knorr et al. (17) se analiza la producción y aplicación del extracto de malta de cebada con alta actividad peptidasa para la degradación del gluten.

Se ha observado que es posible producir un extracto de malta de cebada con alta actividad peptidasa específica de gluten, capaz de degradar secuencias aminoacídicas activas en la enfermedad celiaca, como el péptido 33-mer, entre otros.

Este extracto enzimático tiene como fin la producción de cerveza sin gluten con un contenido del mismo por debajo de 20 mg/kg, con buenos parámetros de calidad.

También en esta línea, Kerpes et al. (18) han observado que para alcanzar una alta actividad peptidasa se requiere un tiempo de germinación prolongado. La actividad peptidasa específica de gluten de la malta de cebada puede verse incrementada si se varían sistemáticamente los parámetros de germinación, con el objetivo de producir cerveza sin gluten.

De acuerdo al trabajo de Scherf et al. (13), algunas de las ventajas de la utilización de peptidasas procedentes de cereales germinados, además de su administración de forma oral, son las siguientes:

- a) Su especificidad de adherencia está optimizada para hidrolizar el gluten.
- b) Si se aplican adecuadamente, son estables y altamente activas.
- c) Pueden obtenerse a través de procedimientos establecidos, como el malteado.
- d) Pueden ser integradas fácilmente en los procesos de producción.
- e) Su uso está bien aceptado por los consumidores.

3.2.2. Peptidasas procedentes de hongos

3.2.2.1. Peptidasas procedentes de *Aspergillus flavus* variedad *oryzae*

Eugster et al. (19) describen las prolil endopeptidasas procedentes de *Aspergillus oryzae*, con capacidad para digerir de forma eficiente péptidos de gliadina ricos en prolina. De acuerdo a la base de datos MEROPS, se trata de dos prolil endopeptidasas de la familia de proteasas S28, denominadas AoS28A y AoS28B, secretadas por *Aspergillus oryzae* cuando éste crece a pH ácido en un medio que contiene proteína como única fuente de nitrógeno. Ambas cepas crecieron durante 48 horas a pH 4 en un medio con proteína de soja y gliadina. La cepa más activa fue la NRRL 2220.

Los principales resultados del estudio fueron:

- a) La proil endopeptidasa secretada por *Aspergillus oryzae* (cepa RIB40) en mayor cantidad fue la cepa AoS28B.
- b) Las dos mayores proil endopeptidasas (AoS28A y AoS28B) fueron secretadas también por la cepa NRRL 2220.

Además, se observó que a pH 7.8, la digestión del péptido 33-mer de la gliadina fue casi completa tras 30 minutos de incubación con la combinación de AoS28B y AoS28A, siendo esta última la más eficiente. Ambas cepas degradaron de manera eficiente el péptido 33-mer, especialmente bajo condiciones ácidas. Las dos enzimas actuaron como proil endopeptidasas estrictas, con preferencia por la degradación de enlaces procedentes de la región N-terminal del péptido 33-mer.

Finalmente, se señala que una combinación de ambas proteasas podría ser relevante en el desarrollo de una terapia enzimática oral para pacientes con intolerancia al gluten.

3.2.2.2. Peptidasas procedentes de *Aspergillus niger*

Salden et al. (20) demostraron por primera vez la capacidad de la enzima AN-PEP para degradar gluten de manera eficiente en el estómago de sujetos humanos. El pH óptimo de esta enzima se encuentra entre 3 y 5, y el pH medio utilizado en las muestras gástricas se situó entre 2.3 y 5.3. Se observó que, con independencia de la densidad calórica de la comida, la enzima degradó casi todo el gluten presente en el estómago en un periodo de 1 hora, mientras que con placebo, el gluten estuvo presente durante 3 horas. Además, la adición de AN-PEP no produjo diferencias en síntomas gastrointestinales en comparación con el placebo, confirmando que el consumo de esta enzima es seguro y bien tolerado por sujetos humanos.

En ausencia de la enzima se observó que, cuanto mayor era la densidad calórica de la comida, menor era la cantidad de gluten que llegaba al duodeno. Posiblemente, el contenido graso de las comidas con gran densidad calórica ayudó a la digestión del gluten en el duodeno, al incrementar los niveles de enzimas pancreáticas.

La enzima evaluada en este trabajo posee la capacidad de reducir significativamente la cantidad de gluten antes de que llegue al duodeno.

Se ha propuesto la utilización de AN-PEP como un suplemento dietético que, junto con la dieta sin gluten, podría ayudar a sujetos intolerantes al gluten en situaciones de ingestión no intencional del mismo. Sin embargo, no está probado que AN-PEP permita consumir gluten de manera segura a sujetos intolerantes a estas proteínas.

En un estudio posterior, König et al. (21) evaluaron las propiedades de AN-PEP para degradar péptidos inmunogénicos, convirtiéndolos en péptidos no inmunogénicos de 8 aminoácidos como máximo. Se confirmó que actúa a pH entre 2 y 8, siendo su pH óptimo entre 4 y 5. El principal resultado es que AN-PEP disminuyó significativamente la concentración de gluten, tanto a dosis altas como bajas, y tanto en estómago como en duodeno, en comparación con el placebo.

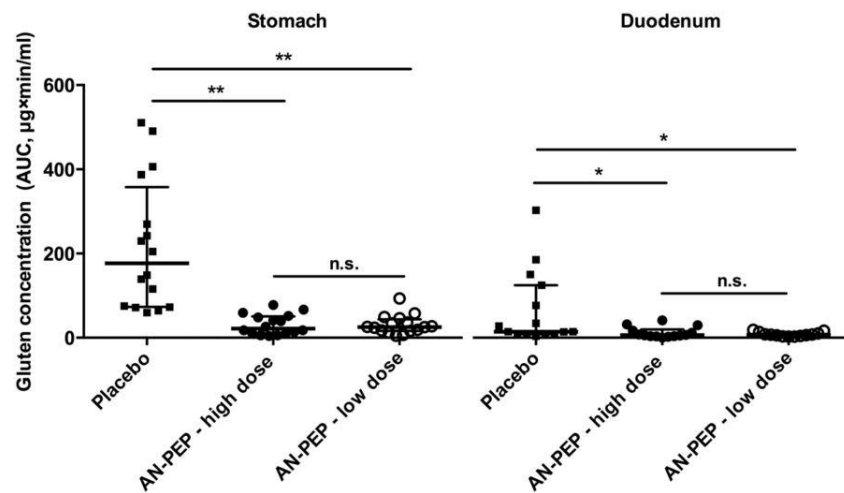


Figura 1. Valores de las concentraciones de gluten en estómago y duodeno. Tanto las dosis altas como las dosis bajas de AN-PEP disminuyeron significativamente las concentraciones de gluten en estómago y duodeno, en comparación con la administración de placebo. (Obtenido de (21))

En conclusión, este estudio mostró que AN-PEP es efectiva degradando pequeñas cantidades de gluten en el estómago como parte de una comida compleja. A pesar de esto, el uso de AN-PEP no reemplaza a la dieta sin gluten en desórdenes relacionados con éste, aunque podría ser efectiva como ayuda en la protección contra el consumo no intencional de gluten.

Heredia-Sandoval et al. (22) estudiaron el efecto de distintas concentraciones de AN-PEP tras incubar el gluten durante 8 horas a 35-40 °C, observándose que la mayor reducción en el contenido de gluten (93%) se encontraba tras su incubación durante 8 horas a 35°C con una dilución de AN-PEP de 1:50 y el 20% de harina de trigo, estableciendo éstas como las mejores condiciones para su degradación.

El uso de AN-PEP para degradar parcialmente las proteínas del gluten es una estrategia efectiva para reducir su inmunogenicidad. Este tratamiento podría ser una buena alternativa para panes con contenido reducido en gluten, después de un análisis sensorial para asegurar la mejor calidad posible.

También pueden ejercer influencia otros factores dietéticos sobre esta enzima. Fueron descritos algunos resultados sobre estos factores. Se incubó el gluten en polvo, con y sin presencia de AN-PEP, observando que AN-PEP degrada el gluten en polvo siguiendo un patrón dosis-dependiente. (23)

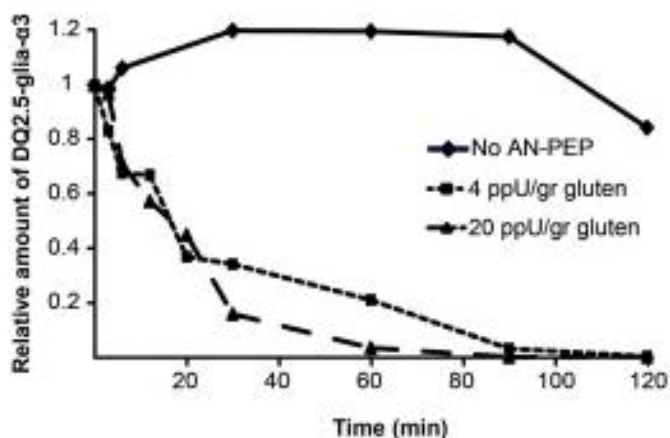


Figura 2. Presencia de DQ2.5-gli-a3 en las fracciones hidrosolubles de las muestras, determinada mediante ELISA. (Obtenido de (23))

Se observó un efecto pronunciado con la presencia de 4-20 PPU/g gluten, manifestado por una completa degradación del gluten tras 60 minutos. Se establece también la actividad de AN-PEP en el rango de pH entre 2 y 8, y con un pH óptimo de 4. La digestión del gluten bajo condiciones similares a las condiciones gástricas es optimizada con la presencia de AN-PEP, encontrando el efecto más pronunciado a concentraciones de 20 PPU/g gluten.

En resumen, el trabajo confirma que AN-PEP es altamente específica para los residuos ricos en prolina, y la degradación de gluten se produce de manera más lenta en presencia de proteínas adicionales (especialmente proteínas lácteas). De hecho, confirman la influencia de la composición de una comida en la cantidad de AN-PEP necesaria para la completa eliminación del gluten. Además, cuando se añaden bebidas carbonatadas, la eficiencia de la degradación del gluten por AN-PEP se ve incrementada.

En el trabajo de Scherf et al. (13) se hace una distinción entre productos de trigo, de centeno y de cebada. Los resultados referentes al trigo muestran unos panes libres de gluten con mejor preservabilidad, sabor y textura, y un mejor perfil de vitaminas B y E, fibra y sales minerales. La combinación de la germinación del salvado de trigo con la capacidad de degradación del gluten de AN-PEP tiene como objetivo producir salvado de trigo libre de gluten con un valor nutricional óptimo, gracias al alto contenido en fibra dietética y folatos. En referencia a la cebada, se concluyó que es posible producir cerveza sin gluten con base de cebada de gran calidad, usando un extracto especial de malta enriquecido con AN-PEP.

3.2.3. Peptidasas procedentes de bacterias

Se han realizado trabajos en los cuales se estudia la capacidad de degradación del gluten de *Pseudomonas aeruginosa*. En el trabajo de Berger et al. (24) se aisló esta bacteria, procedente de la saliva humana y con capacidad degradadora de gluten, de la cual se identificaron 6 cepas distintas.

Se observó que *Pseudomonas aeruginosa* tenía una capacidad significativa para digerir la gliadina, tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas, capacidad que solamente poseían 3 de las 6 cepas testadas.

Además, el sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* también tenía capacidad degradadora sin presencia de la bacteria, resultado que fue observado tras testar 8 cepas y sus sobrenadantes para determinar qué sobrenadantes de estas cepas eran capaces de digerir gliadina sin la presencia de la bacteria. Esta capacidad sólo fue observada en 3 de las 8 cepas testadas. Las otras dos cepas pertenecen a *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*, que también poseen sobrenadantes capaces de digerir la gliadina sin la presencia de la bacteria.

Este método, consistente en aislar bacterias degradadoras de gluten, podría ser una herramienta importante para que éstas fueran detectadas en nuestro medio y en la flora intestinal humana.

Además, Wei et al. (25) aislaron e identificaron microorganismos con capacidad de degradación de gluten procedentes de las heces humanas y activos bajo pH ácido. Se identificó un total de 43 cepas con capacidad de degradación de gluten en gel, todas pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa*. La enzima degradadora de gluten que fue aislada representaba la pseudolisina.

Esta enzima, procedente de *Pseudomonas aeruginosa*, resultó ser activa en gel a pH 2, que de acuerdo a estudios anteriores, es el pH más bajo registrado para la actividad de degradación del gluten.

La pseudolisina pertenece a la familia de las metaloproteasas de la termolisina. Requiere calcio para conferir estabilidad a la actividad peptidasa. En este estudio se ha demostrado experimentalmente que esta enzima es capaz de escindir el péptido 33-mer, que contiene múltiples epítomos inmunogénicos en su secuencia. Esta enzima mostró una capacidad remarcable para escindir y neutralizar los principales péptidos inmunogénicos de gluten, por lo que podría suponer una ayuda futura para el desarrollo de estrategias terapéuticas de digestión del gluten.

En referencia a otras bacterias, Fernández-Feo et al. (26) han tratado de identificar y caracterizar los microbios naturales que residen en la parte alta del tracto gastrointestinal y que son capaces de degradar las gliadinas inmunogénicas implicadas en la enfermedad celiaca. Tras clasificar las cepas en 5 grupos, estos autores observaron que 3 de esas 5 cepas tenían capacidad degradadora:

- *Rothia mucilaginosa* (cepa HOT-681) logró escindir parte del péptido 33-mer en un periodo de 5 horas.
- *Actinomyces odontolyticus* (cepa HOT-701) logró escindir por completo el péptido 33-mer en un intervalo de 2 horas.
- *Capnocytophaga sputigena* (cepa HOT-775) logró escindir el péptido 33-mer rápidamente sin ningún signo de supervivencia de fragmentos mayoritarios tras la degradación.

Otros estudios, a fin de estudiar las características de las heces humanas, han confirmado que éstas contienen proteínas específicas capaces de degradar el gluten e hidrolizar los péptidos tóxicos derivados de la gliadina (33-mer, 19-mer y 13-mer). Gutiérrez et al. (27) han establecido que los pacientes celiacos pueden degradar más eficientemente la gliadina que los pacientes no celiacos, incluso siguiendo una dieta sin gluten estricta. Es posible que estos sujetos hayan desarrollado una capacidad mayor para degradar gliadina, gluten y péptidos tóxicos, como mecanismo de protección.

La hipótesis planteada establece que los pacientes celiacos tienen una actividad de digestión del gluten aumentada, que promueve la proliferación selectiva de microorganismos que generan péptidos más inmunogénicos.

3.2.4. Peptidasas procedentes de insectos

También se han identificado peptidasas con actividad hidrolítica frente a las proteínas del gluten en insectos (28). Las peptidasas de cisteína purificadas procedentes de *Tenebrio molitor* hidrolizaron la fracción de globulina de la avena, así como las fracciones de prolamina ricas en glutamina procedentes de la gliadina de trigo.

Esto concuerda con la idea expuesta en el estudio: las larvas y los escarabajos adultos de *Tenebrio molitor* fueron capaces de hidrolizar las fracciones proteicas del gluten de trigo y del arroz. En comparación con los escarabajos tenebriónidos, *Oryzaephilus surinamensis* y *Rhyzopertha dominica* mostraron actividades más altas frente a los sustratos testados. El extracto de éste último degradó más del 65% del péptido α -gliadina.

3.2.5. Peptidasas producidas mediante ingeniería

Otras peptidasas han sido obtenidas en el laboratorio, como Kuma030 (29), una peptidasa de gliadina que consiguió degradar de forma rápida péptidos inmunogénicos de gliadina en condiciones gástricas.

En un modelo de digestión gástrica del pan de trigo, Kuma030 (gliadin-peptidasa) degradó un porcentaje superior al 99.97% de gluten en 30 minutos. Se observó que Kuma030 es capaz de degradar todos los epítomos inmunodominantes del trigo, la cebada y el centeno.

Siguiendo la línea de las peptidasas creadas a través de ingeniería, Camerlengo et al. (30) han producido y caracterizado molecularmente panes de trigo con contenido reducido en α -gliadinas. Se observó que la delección de la línea Gli-A2/Gli-D2 redujo epítomos inmunogénicos hasta en un 85%.

El uso de nuevas tecnologías, como las tecnologías de edición del genoma, permite introducir cambios específicos en el genoma de trigo en combinación con delecciones, evitando la formación de epítomos tóxicos. Esto podría resultar efectivo para obtener un trigo completamente seguro para pacientes celíacos.

3.2.6. Probióticos: restauración de la microbiota normal

En un estudio de intervención, Geurts et al. (10) reclutaron mujeres obesas usando prebióticos versus placebo, observándose un incremento de *Firmicutes* y *Actinobacteria*, y una reducción de *Bacteroidetes*, mediante el tratamiento con fructanos tipo inulina. Como conclusión, se postuló una interacción fuerte entre la microbiota y los polifenoles, lo que podría resultar de ayuda en innovaciones futuras relacionadas con obesidad y diabetes tipo 2.

Siguiendo esta línea, Caminero et al. (31) han estudiado la diversidad de la microbiota humana implicada en el metabolismo del gluten, así como los microorganismos de interés en la enfermedad celiaca. En el estudio se utilizaron varios medios de cultivo, en los cuales crecen microorganismos que favorecen la hidrólisis del gluten. Entre ellos se encuentran los siguientes:

- MCG1: es un medio pobre en nutrientes, con el gluten como única fuente de nitrógeno. Muestra la diversidad más baja de los tres. La mayoría de los microorganismos que crecen son *Enterococcus*.
- MCG2: medio rico en nutrientes, con la diversidad más alta de los tres. Hay bacterias aisladas no relacionadas con el metabolismo del gluten.
- MCG3: medio con la actividad más alta de los tres, con todas las bacterias aisladas relacionadas con el metabolismo del gluten. Es un medio rico en nutrientes, con el gluten como principal fuente de nitrógeno, y otras fuentes en menor concentración, como el extracto de carne. Es el más interesante.

Las bacterias implicadas en mayor medida en el metabolismo del gluten son *Firmicutes* (~73%) y *Actinobacteria* (~15%), siendo el ~13% restante perteneciente a *Proteobacteria*. Las especies que mostraron alta actividad peptidasa frente al péptido 33-mer fueron las siguientes:

- *Lactobacillus: mucosae* (cepas B1c y D5a1) y *ramnosus* (cepas LA2a, LE3 y D1a).
- *Clostridium: botulinum* y *sporogenes* (todas las cepas aisladas).

Otros autores (32) también observaron que *Streptococcus* y *Lactobacillus* predominaban en el medio MCG3.

Se han realizado varios estudios en los que se observa la importancia de *Lactobacillus*. Es uno de los géneros que más alterado se encuentra en la celiaquía, aunque su papel no está claro.

Francavilla et al. (33) han estudiado una selección de *Lactobacillus* con capacidad de hidrolizar péptidos de gluten durante una digestión gastrointestinal simulada. Se estudiaron 18 cepas comerciales de *Lactobacillus* probióticos con actividad peptidasa variable. La mezcla seleccionada fue capaz de hidrolizar por completo el péptido 33-mer de la gliadina, el péptido 57-68 de la α 9-gliadina, el 62-75 de la A-gliadina y el 62-75 de la γ -gliadina.

Este género también fue utilizado en el trabajo de Álvarez-Sieiro et al. (34), con el fin de generar una cepa recombinante a través de la prolil endopeptidasa de *Myxococcus xanthus*. La cepa recombinante de Mx-PEP muestra un alto grado de detoxificación del péptido 33-mer (lo cual se ha conseguido de manera mucho más efectiva con la cepa *Lactobacillus casei* IPLA1506 frente a la cepa *Lactobacillus casei* IPLA1503, mucho menos efectiva), una resistencia relativa a enzimas pancreáticos y del borde en cepillo, y un pH óptimo de 7. Hay un potente efecto de la acidificación del medio en la actividad enzimática, ya que Mx-PEP es altamente susceptible a la inactivación bajo condiciones gástricas (pepsina y pH bajo).

Siguiendo esta línea, en el trabajo de Tian et al. (35) se ha confirmado que las especies bacterianas que se encuentran significativamente altas en pacientes celíacos y que podrían contribuir a la degradación del gluten en la enfermedad celíaca son las especies de *Lactobacillus*. Entre ellas, la más prevalente es la de *Lactobacillus rhamnosus*.

Además del género *Lactobacillus*, se han realizado varios estudios en los que se remarca la importancia de *Bifidobacterium* en la digestión del gluten. Quagliariello et al. (36) han estudiado una cepa de *Bifidobacterium lactis* y un probiótico que contenía cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estos probióticos resultaron efectivos en la reducción de la permeabilidad epitelial inducida por la gliadina, previniendo la formación del péptido de gliadina durante la digestión *in vitro*.

El probiótico de fórmula administrado demostró una reducción en la producción de TNF- α tras 3 meses de tratamiento en muestras de sangre de pacientes celíacos que siguieron dieta sin gluten. Los celíacos presentaron una alteración en el ratio *Firmicutes/Bacteroides* (normalmente se encuentra bajo).

La administración del probiótico indujo un incremento de *Firmicutes* sin aumentar *Bacteroides*, por lo que el ratio aumentó.

En esta línea, existen evidencias de que *Bifidobacterium* ayuda al desarrollo de *Lactobacillus*, y se ha observado que, tras 3 meses de tratamiento con *Bifidobacterium breve*, la microbiota del paciente celiaco podría asemejarse lo máximo posible a la microbiota de un paciente sano.

3.3. Modificación de la toxicidad del gluten en harinas

3.3.1. Modificación de la estructura del gluten mediante enzimas

En el trabajo de Heredia-Sandoval et al. (37) se han estudiado estrategias para la modificación de las proteínas del gluten durante el proceso de elaboración del pan en la harina de trigo, con el fin de producir panes con gluten menos inmunogénico.

Mediante la modificación de las proteínas en el gluten aislado, es posible inferir las condiciones para reacciones similares durante el proceso de fabricación del pan, en el cual se añaden enzimas y aminoácidos libres a la mezcla inicial de harina de trigo. El tratamiento de la harina de trigo con quimotripsina preserva más favorablemente sus características que el tratamiento con transglutaminasa microbiana (mTG): presentan una mejor apariencia, una miga más homogénea, unos valores de volumen más específicos y una mayor reducción del gluten.

También en esta línea, Zhou et al. (2) han estudiado los mecanismos mediante los cuales la enzima mTG disminuye la inmunogenicidad de los péptidos de gliadina.

La mTG puede modificar el gluten de forma efectiva, y se ha demostrado que la modificación del gluten mediante lisina (Lys) es actualmente la única opción disponible para eliminar la toxicidad del mismo.

3.3.2. Modificación de la estructura del gluten mediante el horneado

En referencia a las técnicas culinarias, se han analizado las variaciones que sufre la digestibilidad de las proteínas del gluten mediante el horneado. Smith et al. (38) han observado que este proceso disminuye la solubilidad (y por tanto la digestibilidad) de las proteínas del gluten de trigo.

La digestión del almidón afecta al grado de digestión de las proteínas, probablemente como consecuencia del complejo gluten-almidón que se forma durante el horneado. La reducción de la solubilidad y digestibilidad de las proteínas del gluten de trigo fue confirmada mediante la técnica de inmunoblotting.

La inclusión de amilasas en el protocolo de digestión consiguió que las proteínas del gluten se solubilizaran y digirieran más rápidamente por endoproteasas pancreáticas.

3.3.3. Modificación de la estructura del gluten mediante aditivos

Con el objetivo de conseguir productos alimenticios seguros para los sujetos celíacos, en el trabajo de Engstrom et al. (39) se ha observado que la combinación de palmitato de ascorbilo con cloruro de zinc como potente detoxificador, podría ser una perspectiva futura para conseguir convertirse en un aditivo con capacidad de detoxificación de gluten, añadido a harinas con el fin de producir alimentos seguros para sujetos celíacos.

3.3.4. Modificación de la estructura del gluten mediante BAL

Con respecto a las bacterias ácido-lácticas (BAL), en el trabajo de Álvarez-Sieiro et al. (40) se ha estudiado el efecto de la incubación de la masa fermentada de forma individual con tres cepas distintas de *Lactobacillus casei* (IPLA 12038, IPLA 12035 y IPLA 12027). Con esta incubación individual, se redujo entre el 90-100% del contenido de gliadina, siendo IPLA 12038 la cepa más activa al reducir más del 82% del péptido en 8 horas, hasta su completa desaparición tras 12 horas. Esta terapia podría usarse como un comienzo en la preparación de masa fermentada, pudiendo permitir la fabricación de productos con mucha menos toxicidad inducida por el gluten.

3.4. Utilidad terapéutica

En las proteínas del gluten, la presencia de secuencias ricas en glutamina y prolina confiere resistencia a las enzimas digestivas humanas. Como consecuencia, aparecen péptidos tóxicos capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria. Así como existen algunas bacterias capaces de degradar el gluten hasta convertirlo en pequeños fragmentos no inmunogénicos, se ha observado que otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* degradan el gluten generando péptidos que mantienen las mismas propiedades inmunogénicas que sus predecesores.

Frente a esto, varios resultados muestran que las especies de *Lactobacillus* generan péptidos poco reactivos tras la degradación del gluten, y son capaces de reducir la toxicidad de *Pseudomonas aeruginosa*. Además de *Lactobacillus*, algunas cepas del género *Bifidobacterium* también podrían ser de ayuda.

Todo esto, unido al hecho de que la disbiosis podría estar implicada en el desarrollo de la enfermedad celiaca, apunta a la microbiota como una entidad que podría participar en la susceptibilidad de un individuo al gluten, por lo que controlar y estudiar la microbiota y los componentes de la misma con capacidad de degradación de gluten es fundamental para posibles innovaciones futuras, y es donde reside su utilidad terapéutica. (5)

Con respecto a la degradación de gluten por peptidasas no humanas, uno de los campos de estudio sobre los cuales existen dudas es la dosis a administrar de estas enzimas. En el trabajo de Salden et al. (20), en el cual se ha estudiado la enzima AN-PEP, las cifras apuntaban a una relación aproximada de 1:16 entre la enzima AN-PEP y el agua en el que se diluía. En el trabajo de Lähdeaho et al. (14), en el cual se ha estudiado la enzima ALV003, se ha señalado una relación de 1:1 entre el gluten ingerido y la enzima administrada. Aunque existen algunas dudas, en este trabajo se ha probado la administración de esta enzima junto con migas de pan, para observar así su capacidad de degradación de gluten. Sin embargo, la forma de administración de estas enzimas aún no está clara.

En relación a los factores que pueden influir en la actividad de la enzima AN-PEP, en el trabajo de Montserrat et al. (23) se ha observado que el proceso de digestión del gluten mediante esta enzima se produce de manera más lenta en presencia de proteínas adicionales (especialmente proteínas lácteas). De hecho, se confirma la influencia de la composición de una comida en la cantidad de AN-PEP necesaria para la completa eliminación del gluten. Además, cuando se añaden bebidas carbonatadas, la eficiencia de la degradación del gluten por AN-PEP se ve incrementada.

A pesar de que en la actualidad los estudios se centran en la dosis y la forma de administración de estas enzimas, su utilidad terapéutica se encuentra en su administración oral junto a la comida, con el objetivo de digerir el gluten.

En relación a las modificaciones producidas en las harinas, se han estudiado tanto la modificación de las proteínas del gluten como la adición de bacterias ácido-lácticas y aditivos. Además de esto, también se han estudiado modificaciones en las técnicas culinarias tales como el horneado.

La utilidad terapéutica de estas técnicas es, a pequeña escala, la modificación de las proteínas del gluten para reducir sus propiedades inmunogénicas. A gran escala, la utilidad terapéutica reside en la aplicación de estas técnicas con el objetivo de fabricar panes con menos gluten, y por tanto más seguros para sujetos celíacos.

3.5. Otros tratamientos no dietéticos en fase de estudio

En los últimos años se han estudiado otros tratamientos experimentales de carácter farmacológico que se encuentran en desarrollo. Estos tratamientos no están basados en la dieta, y entre ellos pueden citarse los siguientes (desarrollo de más a menos avanzado): (9)

- Acetato de larazótido, modulador de las uniones intercelulares densas, que impediría el paso paracelular del gluten a la lámina propia mediante reordenación y cierre de estas uniones. Estudio fase 2b completado.
- Vacunas terapéuticas que intentan conseguir tolerancia al gluten (NexVax2). Finalizado estudio fase 1b, pendiente de iniciar estudio fase 2a.
- Anticuerpo monoclonal anti IL-15 AMG 714 que bloquea la IL-15, considerada un mediador clave en la patogenia de la enfermedad celíaca. Pendiente de iniciar estudio fase 2a en pacientes con enfermedad celíaca refractaria tipo 2 y en no respondedores a la dieta sin gluten.
- Polímero BL-7010, que se une al gluten y lo “secuestra”, impidiendo la exposición al mismo y, por tanto, evitando que se inicie la cascada inmunológica. Finalizada fase 1b, pendiente de iniciar fase 2a.
- Inhibidor de transglutaminasa ZED1227, que bloquea una enzima clave en la etiopatogenia de la enfermedad celíaca. Estudio en fase 1.

Estas alternativas están en fase de investigación, y por el momento se muestran como “complementos” con el fin de evitar el daño que pueden causar contaminaciones o transgresiones dietéticas, pero por el momento no son sustitutivas de la dieta sin gluten.

Puesto que la enfermedad celiaca se caracteriza por una escasa mortalidad, aunque la morbilidad es elevada, y existe un tratamiento de eficacia probada, cualquier tratamiento alternativo sólo podrá ser aceptado si demuestra ser seguro, eficaz y con un coste razonable. La falta de un modelo animal de enfermedad celiaca en el que poder evaluar todos estos parámetros está retrasando la implementación práctica de estas estrategias. Se ha propuesto que cualquier nuevo agente terapéutico debe ser capaz de inducir una buena tolerancia local y sistémica al gluten, no presentar antigenicidad ni efectos secundarios indeseados, y permitir la administración dirigida o la localización específica en el intestino.

4. CONCLUSIONES

1. Las peptidasas obtenidas de bacterias como *Rothia (mucilaginosa y aerea)*, *Actinomyces odontolyticus*, *Capnocytophaga sputigena*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Serratia marcescens*, además de otras procedentes de las heces humanas, podrían degradar proteínas de gluten.
2. También podrían ser eficaces las peptidasas procedentes de cereales germinados (como la Triticain- α), de insectos (como el *Tenebrio molitor*), de plantas (como la *Nigella sativa* o la peptidasa ALV003), o de ingeniería (como el Kuma030).
3. Las evidencias más fuertes corresponden a una prolil endopeptidasa procedente del hongo *Aspergillus niger*, denominada AN-PEP, que podría resultar útil en casos de ingestión accidental de gluten. Algunos factores dietéticos, como el consumo de proteínas y bebidas carbonatadas, podría influir en la actividad de esta enzima.
4. Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* podrían tener un efecto beneficioso en la microbiota intestinal del paciente celiaco y ayudar al desarrollo de ésta, además de prevenir la formación de péptidos tóxicos durante la digestión *in vitro* del gluten.
5. Otros géneros como *Clostridium (botulinum y sporogenes)* y *Streptococcus* podrían tener un efecto positivo en la reducción de la inmunogenicidad del gluten.
6. La modificación proteica o la adición de palmitato de ascorbilo junto con zinc, que funciona como aditivo añadido a harinas, podrían detoxificar el gluten.
7. Las peptidasas de la malta de cebada podrían ser útiles para la producción de cerveza sin gluten, y las bacterias ácido-lácticas junto con AN-PEP podrían ser de ayuda para la fabricación de panes con mayor seguridad alimentaria en sujetos con enfermedad celiaca.
8. El horneado podría reducir la digestibilidad y la solubilidad de las proteínas del gluten.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Girbovan A, Sur G, Samasca G, Lupan I. Dysbiosis a risk factor for celiac disease. *Med Microbiol Immunol.* 2017; 206(2): p. 83-91.
2. Zhou L, Kooy-Winkelaar YMC, Cordfunke RA, Dragan I, Thompson A, Drijfhout JW, et al. Abrogation of Immunogenic Properties of Gliadin Peptides through Transamidation by Microbial Transglutaminase Is Acyl-Acceptor Dependent. *J Agric Food Chem.* 2017; 65(34): p. 7542-7552.
3. Chirido FG. Proteínas tóxicas de los cereales. In Arranz E, Garrote JA. *Enfermedad celíaca; Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca.*: Ergon; 2016. p. 193-205.
4. Chang C, Lin H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016; 30(1): p. 3-15.
5. Caminero A, Verdu EF. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Gastroenterol Hepatol.* 2016; 39 (Supl Espec Congr 2): p. 1-3.
6. D'Argenio V, Salvatore F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta.* 2015; 451 (Pt A): p. 97-102.
7. Passos MDCF, Moraes-Filho JP. Intestinal microbiota in digestive diseases. *Arq Gastroenterol.* 2017; 54(3): p. 255-262.
8. Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr.* 2014; 111(3): p. 387-402.
9. Crespo Perez L, Roy Arino G, Leon F. Nuevas estrategias terapéuticas en desarrollo para la enfermedad celíaca. In Arranz E, Garrote JA. *Enfermedad celíaca; Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca.*: Ergon; 2016. p. 299-309.
- 10 Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef Microbes.* 2014; 5(1): p. 3-17.

- 11 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(4): p. 670-683.
- 12 Luongo D, Treppiccione L, Sorrentino A, Ferrocino I, Turrone S, Gatti M, et al. Immune-modulating effects in mouse dendritic cells of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* isolated from individuals following omnivorous, vegetarian and vegan diets. *Cytokine*. 2017; 97: p. 141-148.
- 13 Scherf KA, Wieser H, Koehler P. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Res Int*. 2016; doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.021.
- 14 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(7): p. 1649-1658.
- 15 Bellir N, Bellir MN, Khelifi D, Bellil I, Medouri A, Medoukali I, et al. Enzymatic degradation of gliadin by *Nigella sativa* seeds protease: implications for new treatment of celiac disease. *World J Pharm Pharm Sci*. 2014; 3(11): p. 507-522.
- 16 Savvateeva LV, Gorokhovets NV, Makarov VA, Serebryakova MV, Solovyev AG, Morozov SY, et al. Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain- α : feasibility for enzymatic therapy assays. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 62: p. 115-124.
- 17 Knorr V, Kerpes R, Wieser H, Zarnkow M, Becker T, Koehler P. Production and application of barley malt extract with high peptidase activity for the degradation of gluten in wort. *Eur Food Res Technol*. 2016; 242(4): p. 585-597.
- 18 Kerpes R, Knorr V, Procopio S, Koehler P, Becker T. Gluten-specific peptidase activity of barley as affected by germination and its impact on gluten degradation. *J Cereal Sci*. 2016; 68: p. 93-99.
- 19 Eugster PJ, Salamin K, Grouzmann E, Monod M. Production and characterization of two major *Aspergillus oryzae* secreted prolyl endopeptidases able to efficiently digest proline-rich peptides of gliadin. *Microbiology*. 2015; 161(12): p. 2277-2288.

- 20 Salden BN, Montserrat V, Troost FJ, Bruins MJ, Edens L, Bartholome R, et al. . Randomised clinical study: *Aspergillus niger*-derived enzyme digests gluten in the stomach of healthy volunteers. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015; 42(3): p. 273-285.
- 21 König J, Holster S, Bruins MJ, Brummer RJ. Randomized clinical trial: Effective . gluten degradation by *Aspergillus niger*-derived enzyme in a complex meal setting. *Sci Rep.* 2017; doi.org/10.1038/s41598-017-13587-7.
- 22 Heredia-Sandoval NG, Calderon de la Barca AM, Islas-Rubio AR. Gluten . degradation in wheat flour with *Aspergillus niger* prolyl-endopeptidase to prepare a gluten-reduced bread supplemented with an amaranth blend. *J Cereal Sci.* 2016; 71: p. 73-77.
- 23 Montserrat V, Bruins MJ, Edens L, Koning F. Influence of dietary components on . *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. *Food Chem.* 2015; 174: p. 440-445.
- 24 Berger M, Sarantopoulos C, Ongchangco D, Sry J, Cesario T. Rapid isolation of . gluten-digesting bacteria from human stool and saliva by using gliadin-containing plates. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240(7): p. 917-924.
- 25 Wei G, Tian N, Valery AC, Zhong Y, Schuppan D, Helmerhorst EJ. Identification of . Pseudolysin (IasB) as an Aciduric Gluten-Degrading Enzyme with High Therapeutic Potential for Celiac Disease. *Am J Gastroenterol.* 2015; 110(6): p. 899-908.
- 26 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 celiac disease and gluten sensitivity. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19(9): p. e386-e394.
- 27 Gutierrez S, Perez-Andres J, Martinez-Blanco H, Ferrero MA, Vaquero L, Vivas S, . et al. The human digestive tract has proteases capable of gluten hydrolysis. *Mol Metab.* 2017; 6(7): p. 693-702.
- 28 Mika N, Gorshkov V, Spengler B, Zorn H, Rühl M. Characterization of novel insect . associated peptidases for hydrolysis of food proteins. *Eur Food Res Technol.* 2015; 240(2): p. 431-439.

- 29 Wolf C, Siegel JB, Tinberg C, Camarca A, Gianfrani C, Paski S, et al. Engineering of Kuma030: A Gliadin Peptidase That Rapidly Degrades Immunogenic Gliadin Peptides in Gastric Conditions. *J Am Chem Soc.* 2015; 137(40): p. 13106-13113.
- 30 Camerlengo F, Sestili F, Silvestri M, Colaprico G, Margiotta B, Ruggeri R, et al. Production and molecular characterization of bread wheat lines with reduced amount of α -type gliadins. *BMC Plant Biol.* 2017; 17(1): p. 248.
- 31 Caminero A, Herran AR, Nistal E, Perez-Andres 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(2): p. 309-319.
- 32 Herran AR, Perez-Andres J, Caminero A, Nistal E, Vivas S, Ruiz de Morales JM, et al. Gluten-degrading bacteria are present in the human small intestine of healthy volunteers and celiac patients. *Res Microbiol.* 2017; 168(7): p. 673-684.
- 33 Francavilla R, De Angelis M, Rizzello CG, Cavallo N, Dal Bello F, Gobbetti M. Selected Probiotic *Lactobacilli* Have the Capacity To Hydrolyze Gluten Peptides during Simulated Gastrointestinal Digestion. *Appl Environ Microbiol.* 2017; doi.org/10.1128/AEM.00376-17.
- 34 Alvarez-Sieiro P, Martin MC, Redruello B, Del Rio B, Ladero V, Palanski BA, et al. Generation of food-grade recombinant *Lactobacillus casei* delivering *Myxococcus xanthus* prolyl endopeptidase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98(15): p. 6689-6700.
- 35 Tian N, Faller L, Leffler DA, Kelly CP, Hansen J, Bosch JA, et al. Salivary Gluten Degradation and Oral Microbial Profiles in Healthy Individuals and Celiac Disease Patients. *Appl Environ Microbiol.* 2017; doi.org/10.1128/AEM.03330-16.
- 36 Quagliariello A, Aloisio I, Bozzi Cionci N, Luiselli D, D'Auria G, Martínez-Priego L, et al. Effect of *Bifidobacterium breve* on the Intestinal Microbiota of Coeliac Children on a Gluten Free Diet: A Pilot Study. *Nutrients.* 2016; doi.org/10.3390/nu8100660.

- 37 Heredia-Sandoval NG, Islas-Rubio AR, Cabrera-Chavez F, Calderon de la Barca . AM. Transamidation of gluten proteins during the bread-making process of wheat flour to produce breads with less immunoreactive gluten. *Food Funct.* 2014; 5(8): p. 1813-1818.
- 38 Smith F, Pan X, Bellido V, Toole GA, Gates FK, Wickham MS, et al. Digestibility of . gluten proteins is reduced by baking and enhanced by starch digestion. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59(10): p. 2034-2043.
- 39 Engstrom N, Saenz-Mendez P, Scheers J, Scheers N. Towards Celiac-safe foods: . Decreasing the affinity of transglutaminase 2 for gliadin by addition of ascorbyl palmitate and ZnCl₂ as detoxifiers. *Sci Rep.* 2017; 7(1): p. 77.
- 40 Alvarez-Sieiro P, Redruello B, Ladero V, Martin MC, Fernandez M, Alvarez MA. . Screening sourdough samples for gliadin-degrading activity revealed *Lactobacillus casei* strains able to individually metabolize the coeliac disease-related 33-mer peptide. *Can J Microbiol.* 2016; 62(5): p. 422-430.
- 41 DSM Nutritional Products. [Online].; 2017. Available from: . https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/en_US/products/nutraceuticals/to-lerase-g.html.

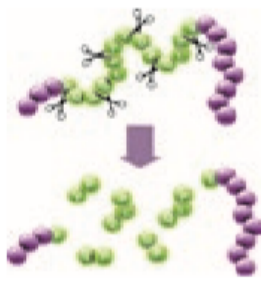
6. ANEXOS

Tolerase® G, a *proline-specific endopeptidase* or *prolyl-oligopeptidase*, is the only dietary enzyme scientifically proven to help break down gluten in the stomach.¹ It gives gluten sensitive consumers following a gluten-free diet more freedom, as they no longer need to worry about accidentally consuming the residual gluten 'hidden' in many foods.

What is gluten?

Found in wheat, barley and rye, gluten is a protein complex that is rich in an amino acid called proline. The human body cannot break down proline-rich proteins efficiently and this may be why up to 13% of the world's population is sensitive to dietary gluten.²

Gluten is well-known for giving bread its shape, strength and texture. It is also in a surprisingly wide range of other foods, including confectionery products, processed meats and sauces.



Tolerase® G cleaves peptides after a proline residue

HEALTH · NUTRITION · MATERIALS

'Hidden' gluten

While 1 in 4 global consumers try to avoid eating foods that contain gluten, this can be almost impossible when dining away from home.³ Studies show that, even when adopting a gluten-free diet, unintentional gluten intake can range from 200 to 3,000 mg/day depending on how strictly the diet is followed.^{4,5,6}

Worry-free dining

Marketed at the growing number of gluten sensitive individuals, Tolerase® G gives consumers the peace of mind to follow a gluten-free diet with more confidence:

- ✓ Scientifically proven to be more effective than any other commercially available supplement.
- ✓ Available in convenient on-the-go formats.

In short:

Backed by regulatory bodies in the United States, European Union (EU), Canada, Australia and New Zealand, Tolerase® G is an IP-protected and uniquely efficacious enzyme for gluten digestion in the stomach:

- ✓ Only enzyme that is scientifically proven to digest proline-rich gluten epitopes *in vitro*, in a gastrointestinal model and in humans.^{7,8,9}
- ✓ Stable and active under low pH stomach conditions.
- ✓ Resistant to digestion by pepsin.
- ✓ Micro-granulated form with excellent flowability and compressibility for use in capsules and tablets.
- ✓ Manufactured in the EU.



Ilustración 1. Presentación de Tolerase G, una comercialización de la enzima AN-PEP lanzada por la franquicia DSM Nutritional Products. (Obtenido de (41))

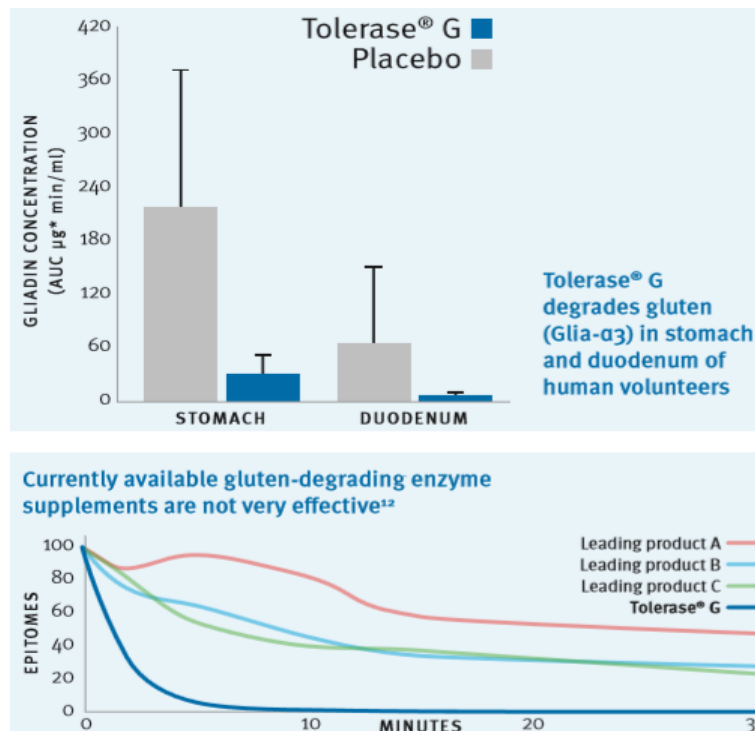


Ilustración 2. Digestión de gluten producida por la enzima Tolerase G versus placebo, tanto en estómago como en duodeno, frente a la digestión de gluten producida por otros productos comerciales. (Obtenido de (41))

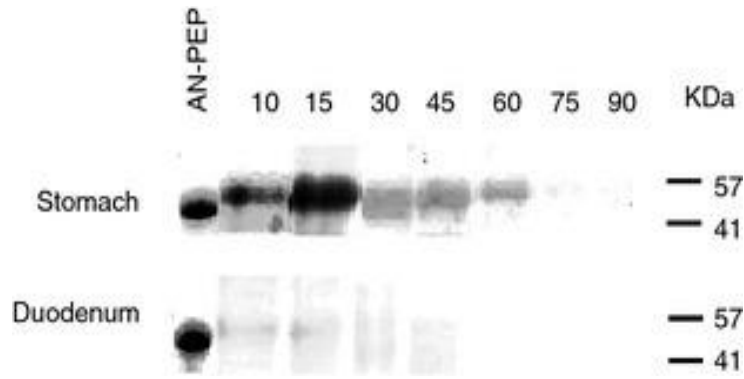


Ilustración 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico mostrando la presencia de AN-PEP en aspirados duodenales. (Obtenido de (20))

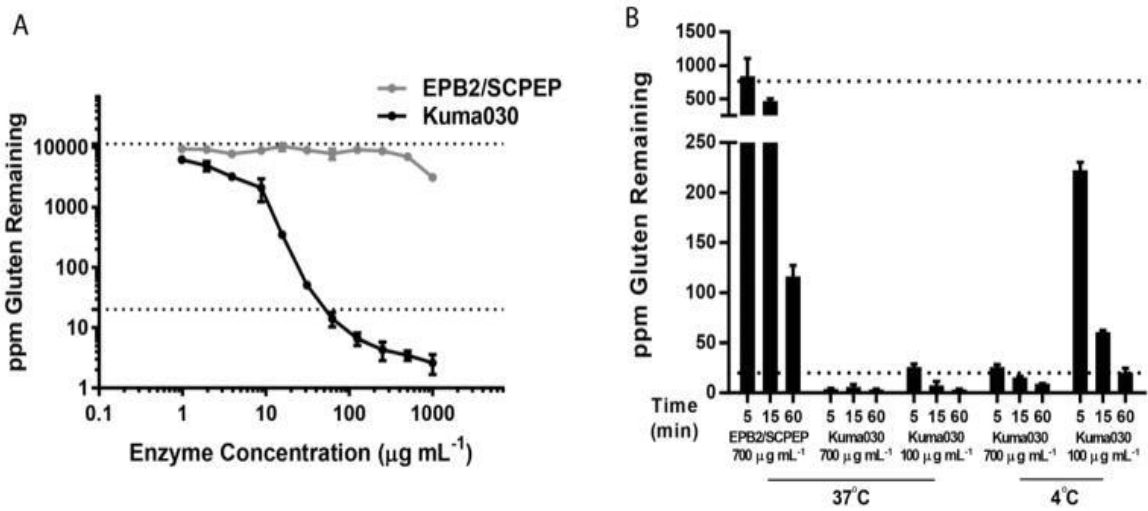


Ilustración 4. Cantidad de gluten en el pan de trigo tras 30 minutos de incubación con Kuma030 o EPB2/SCPEP a las concentraciones enzimáticas indicadas (A). Ambos ejes han sido trazados siguiendo una escala logarítmica (B). (Obtenido de (29))

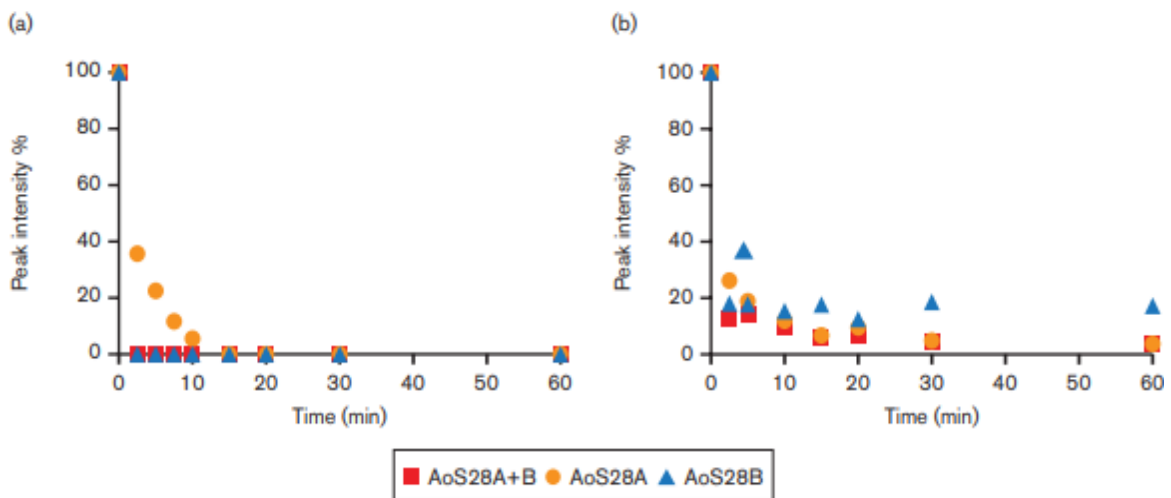


Ilustración 5. Picos de intensidad del péptido 33-mer después de su incubación con la enzima AoS28A, con la enzima AoS28B, y con ambas simultáneamente, a pH 3.8 (a) y 7.8 (b). (Obtenido de (19))

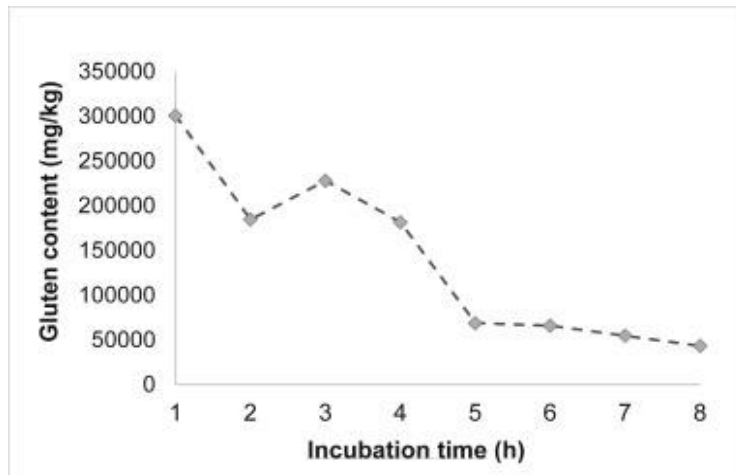


Ilustración 6. Efecto del tiempo de incubación de la harina de trigo tratada con AN-PEP a 40 °C. (Obtenido de (22))

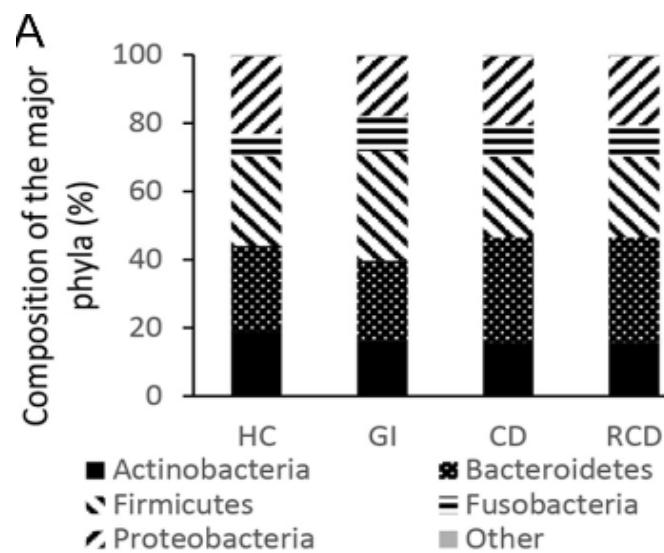


Ilustración 7. Composición y abundancia de las bacterias salivales más abundantes en sujetos sanos (HC), con problemas gastrointestinales (GI), con enfermedad celiaca (CD) y con enfermedad celiaca refractaria (RCD). (Obtenido de (35))