

TRABAJO DE FIN DE GRADO

IMPLICACIÓN DE LA
MICROBIOTA
INTESTINAL EN LA
ENFERMEDAD CELIACA



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Grado en Medicina
Autora: Lucía De La Hoz Marañón
Tutor: Eduardo Arranz Sanz

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	2
2. PALABRAS CLAVE / KEYWORDS	3
3. LISTADO DE ABREVIATURAS	3
4. INTRODUCCIÓN	4
5. OBJETIVOS	5
6. MATERIAL Y MÉTODOS	6
7. RESULTADOS	6
8. DISCUSIÓN	14
9. CONCLUSIONES	18
10. BIBLIOGRAFÍA	19
11. ANEXO	21

1. RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

La enfermedad celiaca es una enfermedad autoinmune del intestino delgado con manifestaciones multisistémicas, desencadenada por la ingesta de gluten en la dieta, que afecta a individuos genéticamente predispuestos. Más de un 30% de la población general es portadora de los alelos de riesgo asociados a la región MHC del genoma, aunque solo un pequeño grupo de portadores desarrollan la enfermedad. Probablemente, esto es debido a factores ambientales diferentes al gluten, que están aún por determinar. Entre los factores más investigados recientemente está la microbiota intestinal, debido a los avances tecnológicos que han permitido identificar y cuantificar los componentes de la misma gracias al estudio de DNA y RNA en muestras biológicas sin necesidad del cultivo. Se han publicado estudios que confirman una asociación entre alteraciones de la microbiota intestinal (disbiosis) y el desarrollo de la enfermedad celiaca, cuyos factores determinantes más importantes se relacionan con la genética, la forma de parto, el tipo de alimentación durante los primeros años de vida y los tratamientos con antibióticos. Un conocimiento más profundo de las alteraciones características de la microbiota en estos pacientes y su papel en la enfermedad pueden permitir el diseño de estrategias terapéuticas complementarias a la dieta sin gluten para mejorar, retrasar o impedir el desarrollo de esta enfermedad.

Abstract

Celiac disease is an autoimmune disease of small intestine with multisystemic manifestations triggered by the diet ingestion of gluten in genetically predisposed individuals. More than 30% of the general population carries the risk alleles associated with the MHC region of the genome, although only a small group of carriers develop the disease. This is probably due to environmental factors other than gluten, which are yet to be determined. Among the most recently investigated factors, one of them is the gut microbiota, as technological advances have made it possible to identify and quantify the components of the gut microbiota thanks to the study of DNA and RNA in samples without the need for cell cultures. Studies have been published confirming an association between alterations in the gut microbiota (dysbiosis) and the development of celiac disease, whose most important determinants are related to genetics, the delivery mode, the type of feeding during the first few years of life and antibiotic treatments. A deeper understanding of characteristic alterations of the microbiota in celiac patients and their role in the disease can enable the design of complementary therapeutic strategies to gluten-free diet that may improve, delay or impede the development of this disease.

2. PALABRAS CLAVE / KEYWORDS

Palabras clave: enfermedad celiaca, microbiota, microbioma, antibióticos, probióticos, cesárea.

Keywords: celiac disease, microbiota, microbiome, antibiotic, probiotic, cesarean section.

3. LISTADO DE ABREVIATURAS

ESPGHAN	Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
tTG	Transglutaminasa tisular
EC	Enfermedad celiaca
FPG	Familiar de primer grado
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
ARG	Alto riesgo genético
MRG	Moderado riesgo genético
BRG	Bajo riesgo genético
RNA	Ácido ribonucleico
LM	Lactancia materna
LA	Lactancia artificial
DSG	Dieta sin gluten
FPG	Familiares de primer grado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SPF	<i>Specific Patogen Free</i> (libre de patógenos específicos)
HMO	Oligosacáridos de la leche humana
IFNγ	Interferón gamma
IL	Interleucina

4. INTRODUCCIÓN

La ESPGHAN (Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición) define la enfermedad celiaca como un **desorden sistémico con base inmunológica** causado por la ingesta de gluten en personas con predisposición genética. Se manifiesta con una combinación variable de



síntomas intestinales y extraintestinales asociados al consumo de alimentos con gluten y se caracteriza por la elevación de anticuerpos específicos en sangre y por una lesión intestinal variable en la pared del duodeno. Afecta al 1-2% de la población, se puede presentar a cualquier edad y es más frecuente en mujeres que en varones.

Es considerada una enfermedad autoinmune única ya que tiene un componente genético principal bien definido (genes de histocompatibilidad de clase II, HLA-DQ2 y DQ8, que codifican las moléculas que intervienen en la presentación de antígenos a los linfocitos T), un autoantígeno (el enzima transglutaminasa tisular - tTG), un desencadenante ambiental fundamental (las proteínas del gluten, presentes en el trigo, la cebada y el centeno) y un tratamiento eficaz (la dieta sin gluten) (1). Sin embargo, resulta curioso el hecho de que más de un tercio de la población general europea son portadores de los alelos HLA-DQ2 o DQ8 pero tan solo un pequeño porcentaje desarrolla la enfermedad (2). Esto, junto con el aumento de la prevalencia de la enfermedad observada en los últimos años, sugiere la existencia de otros factores ambientales implicados en la patogénesis. Un campo emergente en la investigación sobre los factores desencadenantes de la enfermedad celiaca es la microbiota intestinal (3).

La **microbiota intestinal** es el conjunto de microorganismos que habitan en el tubo digestivo, los cuales son indispensables para un correcto crecimiento corporal, desarrollo de la inmunidad y la nutrición (4). Durante los primeros años de vida, varios factores podrían influir en la selección de los diferentes microorganismos: la genética del huésped, la dieta (lactancia materna o artificial), la exposición a medicamentos (como los antibióticos), el tipo de parto (por cesárea o vaginal) y las infecciones (sobre todo intestinales) (5) **Figura 1**. Algunos de estos factores pueden dar lugar a cambios patológicos en la microbiota intestinal, conocidos de forma general como **disbiosis**, que puede implicar tanto la reducción de la diversidad global como un aumento relativo de bacterias patógenas a expensas de la disminución de aquellas con actividad beneficiosa (6). Estudios recientes han confirmado la relación entre la disbiosis intestinal y la enfermedad celiaca, sin embargo, no está claro si esta alteración es causa o efecto de

la enfermedad, sobretodo en la presentación en adultos (7). Además, a raíz del descubrimiento de la disbiosis intestinal observada en pacientes celíacos, se han publicado trabajos que intentan averiguar el papel de cada bacteria en el metabolismo del gluten y, de esta manera, encontrar las bacterias beneficiosas (deficitarias en los pacientes celíacos) para aportarlas en forma de probiótico (23,32).

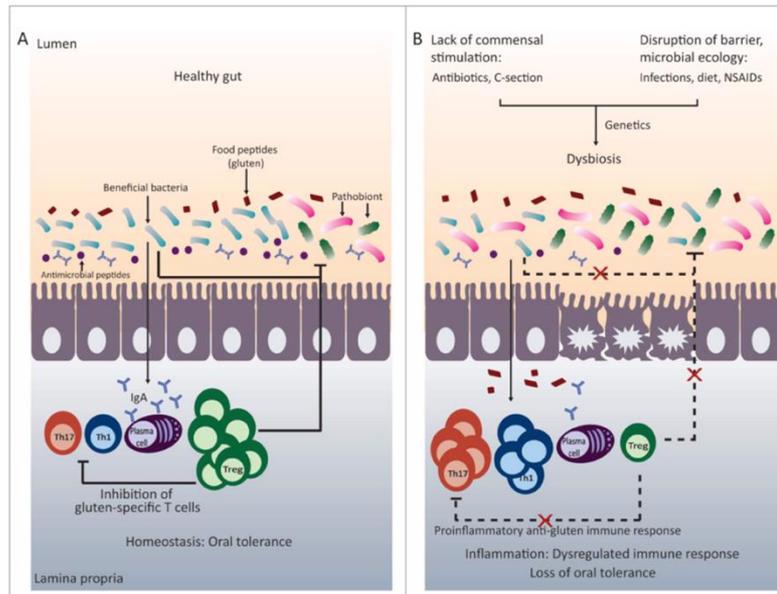


Figura 1: La microbiota y la homeostasis inmune: A. En el intestino sano hay un equilibrio entre bacterias beneficiosas y perjudiciales. En situaciones de homeostasis, el equilibrio entre células proinflamatorias (Th1 y Th17) y células T reguladoras permite la generación de tolerancia oral a proteínas de la dieta, como el gluten. B. La colonización microbiana en los primeros años de vida o alteraciones de la función barrera intestinal, puede dar lugar a disbiosis y desequilibrios entre células proinflamatorias y reguladoras. En individuos genéticamente predispuestos, estos desequilibrios llevan a la pérdida de tolerancia a proteínas como el gluten. (37)

5. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es:

1. Conocer posibles factores capaces de inducir modificaciones de la microbiota intestinal como desencadenante de la enfermedad celíaca.

Como **objetivos secundarios** se incluyen:

- a. Confirmar el papel patogénico o protector de las principales bacterias de la microbiota intestinal en relación con la enfermedad celíaca.

- b. Valorar la posible utilidad de los probióticos como herramienta terapéutica complementaria a la dieta sin gluten.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una **revisión sistemática** de la literatura en las bases de datos más utilizadas con la finalidad de recopilar la evidencia científica disponible sobre cambios en la microbiota intestinal y su papel en la patogénesis de la enfermedad celiaca.

La búsqueda ha sido realizada entre el día 1 de octubre de 2019 y el último día de febrero del 2020 utilizando “PubMed” como base de datos principal y las siguientes palabras clave: “celiac disease”, “microbiota”, “microbiome”, “antibiotic”, “probiotic”, “cesarean section”. Tras diferentes combinaciones de las palabras clave mencionadas y utilizando como filtros los ensayos clínicos controlados aleatorizados, estudios clínicos, estudios observacionales, estudios comparativos y estudios en gemelos publicados en los últimos 10 años, y la selección del idioma tanto en inglés como en español, se obtuvo un total de 67 artículos, de los que finalmente se seleccionaron 24 para la realización de este trabajo, de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión:

- Adultos o niños con diagnóstico de enfermedad celiaca confirmada mediante biopsia intestinal.
- Número de pacientes igual o mayor a 10.

7. RESULTADOS

Influencia de la genética en la microbiota intestinal

En uno de los estudios recogidos (7) se comparó la microbiota en biopsias duodenales y muestras fecales de 62 pacientes, de los cuales 23 eran celíacos al diagnóstico, con dieta normal (portadores de genes HLA-DQ2/DQ8, anticuerpos anti-tTG positivos, biopsia con lesión Marsh grado 2), 15 familiares de primer grado (FPG) sanos (sin alteraciones en la biopsia y anticuerpos negativos) de pacientes con enfermedad celiaca (EC) y 24 controles enfermos (portadores del virus de la hepatitis C o dispepsia funcional pero con anticuerpos específicos negativos y



biopsia normal). Las biopsias duodenales mostraron mayores diferencias comparadas con las muestras fecales, lo que sugiere una mayor alteración de la microbiota a ese nivel. La microbiota duodenal de los pacientes con EC se caracterizaba por los géneros *Megasphaera* y *Helicobacter* en comparación con los otros dos grupos diagnósticos. Además, se observó una menor cantidad de bacterias como *Ruminococcus*, *Intestinibacter*, *Parvimonas*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Anaerostipes* en comparación con los FPG. Por último, tanto en pacientes con EC como FPG se encontró una menor cantidad de *Barnesiella* (en la microbiota duodenal) y *Akkermansia* (en la microbiota fecal) en comparación con los pacientes sin EC.

En otro trabajo, se analizó la microbiota de 47 niños familiares de primer grado de un paciente con EC confirmada con biopsia, de los cuales 34 eran portadores de HLA-DQ2 y/o DQ8 (8). Estos autores han observado que la composición de la microbiota en estos niños no se asemeja a la de los adultos a los 2 años de edad, lo que si ocurre en los niños sin riesgo genético. Además, han observado una menor cantidad de *Bacteroidetes* (<1%) y mayor cantidad de *Firmicutes* en los niños portadores.

En un estudio de casos y controles anidado en un estudio de cohortes prospectivo (9), se realizó un seguimiento durante 5 años a más de 200 niños con al menos un familiar celíaco confirmado con biopsia, seleccionándose 10 niños que no desarrollan la enfermedad y 10 que si la desarrollan. En los sanos se observa una mayor cantidad de TNF- α relacionada con *Bifidobacterium*, una mayor abundancia relativa de *B. longum*, mayor proporción de *Firmicutes* y un aumento en la diversidad de la microbiota a lo largo del seguimiento. Mientras que los niños que si desarrollan la enfermedad presentan mayores proporciones de *B. Breve*, *Enterococcus spp* y no experimentan ese aumento en la diversidad de la microbiota.

En otro trabajo, un estudio de tipo observacional prospectivo (10) de 5 años de duración, se seleccionaron 127 niños FPG de pacientes con EC. Se les clasificó en 3 grupos: 25 de alto riesgo genético (ARG) (20% de riesgo de desarrollar EC), 59 de moderado riesgo genético (MRG) (7% de riesgo de desarrollar EC) y 43 de bajo riesgo genético (BRG). De estos niños, 92 nacieron por parto vaginal y 35 por cesárea. Se tuvo también en cuenta el tipo de alimentación que recibieron, mediante lactancia materna (LM) o artificial (LA). Se analizaron muestras fecales a los 7 días de nacer, al mes y a los 4 meses. A los 4 meses se observó una mayor prevalencia de *E. Coli* enterotoxigénica en los niños de ARG en comparación con los niños de MRG, tanto en los alimentados por LA como por LM. La misma tendencia se observó al compararlos con los de BRG, pero solo se encontraron diferencias significativas en el subgrupo de LM.

Por último, en un estudio realizado con 27 niños de ARG se tomaron muestras fecales a los 9 y 12 meses de edad y se analizó la microbiota fecal mediante secuenciación genética del RNA ribosomal 16S (11). De estos niños, 9 desarrollaron EC con una media de edad de 3.5 años. Al comparar su microbiota con la de los niños que no desarrollaron la enfermedad, no se encontraron diferencias significativas. Se tuvo en cuenta la duración de la LM, el tipo de nacimiento, la edad de introducción de la comida sólida o del gluten y la exposición a antibióticos, y tampoco encontraron diferencias significativas.

Influencia del modo de parto en la microbiota intestinal



En el estudio TEDDY (estudio sobre los determinantes ambientales de la diabetes tipo I en el que también se analizan algunos factores relacionados con la EC) (12), se realizó un seguimiento de 1600 niños nacidos por cesárea procedentes de Alemania, Suecia, Estados Unidos y Finlandia con ARG (portadores de HLA-DQ2 o DQ8) desde 2004 hasta 2010, de los cuales 979 desarrollaron anticuerpos anti-tTG sin enfermedad y 343 desarrollaron EC. Al analizar la asociación entre el nacimiento por cesárea y el desarrollo de anticuerpos o de enfermedad, no se encontró asociación.

En un estudio de cohortes retrospectivo (13) se utilizó el registro de nacimientos nacional de Suiza, con acceso a la información de 1.912.204 niños nacidos entre 1991 y 2009, de los cuales 6596 desarrollaron EC después de los 15 años. Se observó un aumento del riesgo de padecer EC en niños nacidos por cesárea electiva, sugiriendo la implicación de la disbiosis intestinal en edades tempranas.

En un estudio de tipo observacional prospectivo (14), se analizó la influencia de diferentes factores sobre la composición de la microbiota en 55 niños de 4 meses de edad con al menos un familiar celiaco de primer grado. Estos niños fueron clasificados en diferentes grupos de acuerdo al tipo de parto, la exposición materna a antibióticos durante el embarazo y el parto, tipo de lactancia y administración de antibióticos durante la infancia. Tras analizar las muestras de 44 niños (los 11 restantes no recogen sus muestras) se ve una menor cantidad de *Bifidobacterium catenulatum* y mayor cantidad de *B. angulatum* en la microbiota intestinal de los niños nacidos por cesárea.

Influencia de la dieta en la microbiota intestinal

En un estudio experimental (15) se analizó la microbiota fecal de 10 sujetos sanos tras un mes siguiendo una dieta sin gluten (DSG) (menos de 20 ppm de gluten). Se observó una disminución de bacterias beneficiosas (*Bifidobacterium*, *B. longum* y *Lactobacillus*) y un aumento de las patógenas (*E. coli* y *Enterobacteriaceae*), de forma paralela a la reducción de la ingesta de polisacáridos asociada a la DSG. Además, las muestras fecales de estos sujetos tras la dieta, en comparación con los sujetos con una dieta normal, mostraron una menor producción de citosinas inducidas por bacterias, tanto proinflamatorias (TNF α , IFN γ e IL-8) como antiinflamatorias (IL-10). La reducción de esta última puede ser explicada por la disminución de *Bifidobacterium* y *B. longum*, ya que son las principales bacterias que inducen su producción.

En un trabajo similar al anterior pero con 21 voluntarios sanos sometidos durante 4 semanas a una DSG (16) se observó, principalmente, una reducción de bacterias de la familia *Veillonellaceae*.

En uno de los trabajos mencionados anteriormente (10) se analizó la microbiota en el subgrupo de niños alimentados por LA, observándose una mayor prevalencia de *C. Perfringens* a los 7 días y *C. Difficile* a los 4 meses de vida. También se observa una mayor prevalencia de esta última en niños de BRG y MRG alimentados por LM.

Por último, en otro trabajo ya mencionado (14) se observó que la alimentación por LA se asociaba a menor cantidad de *B. angulatum* en la microbiota.

Influencia de la exposición a antibióticos en la microbiota intestinal

En un estudio de casos y controles (17) se analizó la asociación entre la exposición a antibióticos y el desarrollo de EC en 2933 pacientes con EC y lesión Marsh 3, 2118 con Marsh 1-2 y 620 con mucosa normal pero serología específica de EC positiva. Se encontró una asociación positiva entre el uso sistémico de antibióticos con la EC y con pacientes con mucosa normal y serología positiva. La OR en los casos fue similar cuando se excluía el uso de antibióticos en el último año. El antibiótico más usado fue la penicilina V, pero no se encontró una relación significativa. La asociación más fuerte se encontró con las quinolonas, posteriormente macrólidos y penicilinas de espectro ampliado. **(ANEXO 3)**



En el estudio observacional prospectivo, mencionado anteriormente (14), se observó una fuerte asociación entre el uso de antibióticos durante los 4 primeros meses

de vida y la alteración de la composición de la microbiota en niños de ARG. Se confirmó la presencia de una mayor cantidad de *Bacteroides fragilis* y de *B. angulatum*, además de una menor cantidad de *B. longum* y *Bifidobacterium spp.*

En un estudio de cohortes (18) que incluía un total de 8729 niños, se identificaron 1836 que habían estado expuestos a antibióticos durante la gestación y 46 de ellos habían desarrollado EC al final del periodo de seguimiento. Se evaluó la asociación entre esta exposición y el posterior desarrollo de EC, no encontrándose una asociación estadísticamente significativa.

En otro estudio (19), en el que se evaluó el efecto de la amoxicilina sobre la microbiota en 24 pacientes sanos, se observaron cambios importantes en el microbioma que persistieron hasta 42 días tras la finalización del tratamiento. El cambio más significativo fue un aumento de *Escherichia/Shigella*.

En un estudio observacional nacional realizado en Dinamarca y Noruega (20) donde se recogieron datos de 1.168.656 niños, se identificaron 1427 casos que desarrollaron EC (0.12%). Del total, 451.196 niños sin EC y 622 con EC habían recibido tratamiento antibiótico sistémico en algún momento de su vida. Se encontró una relación dosis-dependiente entre la exposición a antibióticos sistémicos durante el primer año de vida y el aumento del riesgo a padecer EC. Ningún tipo específico de antibiótico o edad en el momento de la exposición fue prominente (excepto en la cohorte de niños noruegos de 0-6 meses), sugiriendo que no había una edad vulnerable específica y un efecto similar para todos los tipos de antibióticos, aunque el bajo uso de algunos antibióticos limitaba el estudio de estos.

En otro estudio realizado en Italia con una cohorte de 203.000 niños nacidos en el noreste del país (21) se investigó el papel de los antibióticos durante el primer año de vida como posible factor de riesgo para el desarrollo de EC. De estos, 866 niños desarrollaron EC confirmada mediante biopsia. Se encontró una asociación significativa entre el uso de penicilinas y cefalosporinas (sobre todo las de 3ª y 4ª generación) y la EC con relación dosis-dependiente. El uso de macrólidos no reveló resultados significativos. **(ANEXO 4)**

Finalmente, en un estudio realizado utilizando un modelo animal de EC (ratones portadores de alelos HLA-DQ8) se evaluó el papel de la microbiota en la modulación de la respuesta del huésped al gluten (22). Se utilizaron 3 tipos de ratones: libres de gérmenes, limpios libres de gérmenes específicos (limpios SPF) (con una microbiota caracterizada por miembros del filo *Bacteroidetes* y *Firmicutes* la ausencia de patógenos oportunistas o bacterias del filo *Proteobacteria*) y convencionales SPF (caracterizados por una microbiota que incluye patógenos oportunistas). Para evaluar si la expansión del filo *Proteobacteria* en ratones convencionales SFP podía exacerbar la patología

inducida por el gluten, trataron con vancomicina perinatal a modelos animales de EC (ratones SPF convencionales NOD/DQ8). Este experimento dio lugar a un aumento relativo en la abundancia de *Proteobacteria* y *Firmicutes* y descenso relativo de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Tenericutes*. El análisis genético de las muestras procedentes de los ratones tratados con el antibiótico, mostró una mayor abundancia de *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pasteurella*, *Betaproteobacteria* sin clasificar y *Lactobacillus*; y menor abundancia de bacterias de la familia *Lachnospiraceae*, *Bacteroides* y *Parabacteroides*. Además, se observó un incremento más marcado de los linfocitos intraepiteliales tras la administración del gluten en los ratones que recibieron el antibiótico, en comparación con los que no lo recibieron.

Papel de las bacterias en el metabolismo del gluten

En un estudio (23) basado también en un modelo animal de EC (ratones que expresan alelos HLA DQ2 y/o DQ8) se demuestra que la elastasa producida por *P. aeruginosa* actúa de forma sinérgica con el gluten induciendo una inflamación aún más severa asociada con una atrofia vellosa moderada.

Uno de los trabajos encontrados (24), tiene como objetivo caracterizar la microbiota del intestino delgado que pueda estar implicada en la hidrólisis del gluten. Esto se realizó mediante el cultivo de muestras duodenales en un medio con gluten de individuos diagnosticados de EC, tanto tratados como no



tratados, FPG de pacientes celíacos y voluntarios sanos. Los resultados mostraron que en el intestino humano hay bacterias capaces de degradar el gluten pero que no existen diferencias entre la microbiota intestinal en los diferentes grupos diagnósticos. De las cepas aisladas (**ANEXO 5**), unas mostraron actividad proteolítica extracelular para el gluten y otras, actividad peptidolítica frente al péptido 33-mer (el péptido conocido más inmunogénico para los pacientes con EC). *Lactobacillus* fue el grupo aislado más frecuentemente, sobre todo *L. gasseri*. Los patógenos oportunistas fueron aislados solo en los pacientes con EC: *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Streptococcus anginosus*, que, precisamente, mostraron una fuerte actividad proteolítica extracelular. Las bacterias capaces de hidrolizar el péptido 33-mer pertenecían al filo *Firmicutes* (*Bacillus* y *Lactobacillus*) *Prevotella*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. Por último, el análisis mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) mostró que los géneros predominantes en el cultivo en fueron *Streptococci* y *Lactobacilli*.

En el estudio en modelos animales mencionado anteriormente (22), se observó que la colonización del intestino de los ratones libres de gérmenes con la microbiota de los ratones limpios SPF prevenía la aparición de la alteración inmune inducida por el gluten (evaluada mediante la presencia de linfocitos intraepiteliales, marcadores de citotoxicidad intraepitelial, anticuerpos específicos frente a la gliadina y respuesta proinflamatoria frente a la gliadina mediada por células T) en los ratones libres de gérmenes. Por otro lado, se observó que la patología inducida por gluten en los ratones SPF convencionales era más severa que en los SPF limpios. El tratamiento con antibióticos, que condujo a la expansión del filo de *Proteobacteria*, empeoró aún más la inmunopatología inducida por el gluten en ratones SPF convencionales. Por último, la protección contra las alteraciones inducidas por el gluten en ratones SPF limpios se invirtió después de la suplementación con un miembro del filo *Proteobacteria*, un *Escherichia coli* enteroadherente aislado de un paciente con EC.

Además, en otro de los trabajos recogidos mencionado anteriormente (7), se estudiaron también diferencias en la microbiota entre pacientes celíacos, FPG e individuos no celíacos sin riesgo genético, confirmándose que la capacidad para la degradación del gluten por la microbiota fecal estaba reducida en los pacientes con EC.

Probióticos como tratamiento complementario a la dieta sin gluten

En un estudio con niños celíacos en tratamiento con DSG (25) se evaluó el efecto de la administración durante 3 meses de un suplemento alimentario basado en dos cepas de *Bifidobacterium breve* (B632 y BR03) con el objetivo de restaurar el equilibrio de la microbiota intestinal. Se extrajo el DNA microbiano de muestras de heces de 40 niños celíacos antes y después del probiótico o del placebo y de 16 niños sanos (grupo control). El análisis de la microbiota de los niños celíacos previo a la administración del probiótico se caracterizaba principalmente por un descenso en la proporción de *Firmicutes/Bacteroidetes*, así como la disminución de *Actinobacteria* y *Euryarchaeota*, en comparación con los niños sanos. Tras la administración del probiótico se observó un aumento de *Actinobacteria* y el restablecimiento de la proporción fisiológica de *Firmicutes/Bacteroidetes*. **(ANEXO 6)**

En un estudio similar al anterior (26) se analizó el efecto del mismo probiótico en 49 niños celíacos con DSG (24 recibieron el probiótico y 25 el placebo) y 18 niños sanos como grupo control. En los niños que recibieron el probiótico los niveles de TNF α disminuyeron de forma significativa; además, después del seguimiento durante 3 meses más tras de la administración del probiótico, se observó de nuevo un aumento del TNF α .

En otro ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, con 36 niños recientemente diagnosticados de EC y en tratamiento con DSG (27) se evaluó el efecto de la administración diaria de *Bifidobacterium longum* CECT 7347 durante 3 meses. El grupo que recibió el probiótico presentó un mejor percentil de crecimiento ponderal, una disminución del número de linfocitos T CD3+ en sangre periférica y de los niveles de TNF-alfa en suero, así como una disminución de *Bacteroides Fragilis* y sIgA en heces, en comparación con el placebo.

En otro estudio experimental (28) se analizó el efecto de la administración de un probiótico compuesto por *Bifidobacterium infantis* en comparación con la DSG sobre la expresión de α -defensina-5 y el número de células de Paneth y macrófagos en la mucosa intestinal. En el estudio fueron incluidos 12 pacientes con EC activa tratados exclusivamente con *Bifidobacterium infantis* durante 3 semanas, 24 pacientes celíacos sin tratamiento y 5 en tratamiento únicamente con DSG durante un año. Por un lado, la DSG demostró disminuir el recuento de macrófagos de la mucosa intestinal. Por otro lado, la administración de *B. infantis* durante tres semanas en pacientes celíacos sin tratamiento de DSG confirmó una disminución de la expresión de α -defensina-5 en el intestino (la cual suele estar aumentada en pacientes con EC activa por la sospecha de la metaplasia producida en las células de Paneth en estos pacientes). También se observó que el número de macrófagos tendía a disminuir con esta intervención, pero no de forma tan clara como con la DSG **(ANEXO 7)**.

Finalmente, en un estudio experimental (29) con 15 niños sanos sin antecedentes familiares de intolerancias alimenticias y 15 niños celíacos en tratamiento con DSG, se analizaron las muestras fecales de ambos grupos con el objetivo de observar las diferencias en su microbiota y seleccionar cepas de *Lactobacilli* de las heces de niños sanos con potencial uso como probiótico. El análisis de las bacterias cultivables más comunes no mostró diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al recuento total de aerobios y anaerobios. Sin embargo, el recuento de *Lactobacilli* sí fue significativamente menor en el grupo de niños celíacos. Para seleccionar las mejores cepas por su posible uso como probiótico, se seleccionan *L. rhamnosus* y *L. paracasei* por su alta resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal y sus propiedades de auto-agregación e hidrofobicidad, respectivamente.

8. DISCUSIÓN

La EC es un trastorno con una prevalencia importante en la población cuyo componente genético es imprescindible para su desarrollo. Sin embargo, aproximadamente un tercio de la población es portadora de los alelos HLA característicos de esta enfermedad y tan solo un pequeño porcentaje llega a padecerla. Por ello, actualmente hay un gran interés en el estudio de otros factores ambientales, además del gluten, que puedan estar implicados en la etiopatogenia de la EC. Uno de los campos emergentes en investigación es la implicación de la microbiota intestinal, ya que varios factores que alteran su composición han sido relacionados con un aumento del riesgo de desarrollar EC, como son la genética del huésped, el tipo de parto, la dieta y la exposición a medicamentos como los antibióticos. Además, se han publicado varios estudios que intentan averiguar el papel de cada bacteria en el metabolismo del gluten y encontrar bacterias beneficiosas (deficitarias en los pacientes celíacos) para aportarlas en forma de probiótico.

En cuanto a la **genética**, si revisamos la bibliografía existente encontramos numerosos trabajos que sugieren que los alelos HLA DQ2 y DQ8 (30,31) e incluso otros alelos de genes no HLA (como el gen de la fucosiltransferasa 2) (32,33) influyen en la selección de la microbiota intestinal durante los primeros años de vida. Se han encontrado trabajos que apoyan esta hipótesis por hallazgos como la disminución de bacterias beneficiosas en pacientes portadores de estos alelos: *Streptococcus* (que posee enzimas que degradan el gluten), *Bifidobacterium* (conocida por sus propiedades probióticas), *Bacteroidetes* (entre los cuales se encuentra *B. fragilis*, capaz de estimular la producción de citosinas antiinflamatorias por las células T), *Barnesiella*, *Akkermansia* y *Anaerostipes* (capaces de producir ácidos grasos de cadena corta que contribuyen al mantenimiento de la función y la integridad epitelial). Junto con una mayor prevalencia de bacterias potencialmente patógenas como: *Helicobacter*, *E. coli* enterotoxigénica y *C. difficile*. Los hallazgos de Sellito y cols (8) sobre la disminución del género *Bacteroidetes* y el aumento de *Firmicutes* en pacientes portadores de alelos de riesgo entra en controversia con otros trabajos que muestran un aumento de los mismos (31). Lo mismo ocurre con el hallazgo sobre el aumento de *B. breve* en celíacos (9). Esto puede ser explicado por diferencias en los métodos utilizados para la extracción, conservación y análisis de muestras en cada estudio. La controversia observada en el trabajo de Rintala y Cols (11) en el que se niega la existencia de diferencias significativas entre la microbiota los pacientes celíacos e individuos sanos puede ser debida al reducido número de pacientes del estudio.

Sobre el **tipo de parto**, el nacimiento por cesárea se ha asociado con un aumento del riesgo de padecer EC. La explicación que sugiere la bibliografía actual es que la cesárea impide o disminuye mucho la transmisión vertical de microorganismos beneficiosos que se adquieren al entrar en contacto con el canal del parto (microorganismos vaginales y fecales, sobre todo *Bifidobacterium* y *Bacteroidetes*) (34). Por el contrario, los primeros microorganismos con los que entra en contacto el niño nacido por cesárea son los característicos de la piel y los nosocomiales del medio hospitalario, lo que supone una disminución en la diversidad de su microbiota y alteraciones en la inmunidad tanto innata como adaptativa que persisten durante varios años (35). Estos resultados han sido apoyados por los obtenidos en otros estudios, que confirman la disminución de *Bifidobacterium catenulatum* en niños nacidos por cesárea y la asociación del nacimiento por cesárea electiva con la EC en el estudio de cohortes (13) (explica que en una cesárea urgente tras la rotura de membranas y el comienzo del trabajo de parto, el niño sí se ve expuesto a estos microorganismos). Sin embargo, los resultados del estudio TEDDY (12) discrepan de lo anterior. Sus autores proponen que la discrepancia observada en este estudio con los previos sobre la influencia del parto en el desarrollo de la EC puede ser debidas a la compleja interacción y dependencia entre las características de madre/hijo, el tipo de parto, alimentación post-parto y drogas utilizadas durante este periodo. Además, una limitación de este estudio es la ausencia de información sobre si la cesárea fue electiva o urgente.

Es interesante comentar que la **dieta sin gluten**, que es precisamente el tratamiento de la EC, puede modificar también microbiota intestinal en individuos sanos e inducir alteraciones perjudiciales. Estas alteraciones pueden ser explicadas por la reducción de la ingesta de polisacáridos que actúan como prebióticos para la microbiota intestinal. Por un lado, se observan efectos beneficiosos como la disminución en la producción de citosinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ e IL-8) y la disminución del número de macrófagos. Sin embargo, tiene otros efectos que son perjudiciales como la disminución de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Veillonellaceae* (esta última pertenece al género *Firmicutes*, que es uno de los más abundantes en la microbiota de pacientes sanos) y de las citosinas antiinflamatorias asociadas (IL-10) y el aumento de algunas bacterias patógenas (*E. coli* y *Enterobacteriaceae*). Estos resultados podrían sugerir que la DSG no es suficiente para tratar la disbiosis intestinal característica de la EC, por lo que los pacientes podrían beneficiarse de un tratamiento complementario con probióticos.

En cuanto al **tipo de lactancia**, la evidencia científica actual sugiere un papel beneficioso de la LM sobre la microbiota por el efecto prebiótico de los oligosacáridos presentes en la leche humana (HMOs) que favorecen sobre todo, el crecimiento de

Bifidobacterium y dificultan el crecimiento de bacterias patógenas como *E. Coli* o *C. perfringens* (36). Sin embargo, el hallazgo de una mayor prevalencia de *C. difficile* en niños de BRG y MRG en comparación con los de ARG nos impide confirmar su papel protector. La LA carece de estos oligosacáridos, por lo que sus efectos beneficiosos sobre la microbiota se ven reducidos como muestran los resultados de los estudios en esta revisión (10,14): mayor número de *C. perfringens* y *C. difficile* (microorganismos patógenos) y una disminución de *Bifidobacterium angulatum*. Sin embargo, en esta revisión no se ha podido confirmar su relación con el posterior desarrollo de la enfermedad celiaca.

En relación con **la exposición a antibióticos**, los resultados de los estudios encontrados sugieren que estos fármacos pueden estar relacionados con la disbiosis intestinal que podría aumentar, a su vez, el riesgo de padecer la enfermedad. Los antibióticos con una asociación más fuerte con la disbiosis intestinal son las quinolonas y las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación seguidas de las penicilinas de amplio espectro, pero no con penicilina V. Sin embargo, los resultados sobre la asociación de EC con macrólidos son controvertidos. Los autores de estos hallazgos (18,21) proponen como explicación a la asociación encontrada que esta se debe a una disrupción del equilibrio del sistema inmunitario en el intestino por la alteración de la microbiota. Esto se ve apoyado por el aumento de *Escherichia/Shigella* tras la administración de amoxicilina en pacientes sanos y la alteración en la microbiota encontrada en modelos animales tras la administración de vancomicina (con un aumento de *Proteobacteria*, *Escherichia* y *Helicobacter* y disminución de *Actinobacteria*, género que incluye *Bifidobacterium*, *Bacteroidetes* y *Parabacteroides*, que han demostrado ser protectoras frente a algunos tipos de colitis). Además, algunas de las alteraciones encontradas en la microbiota de niños que habían sido expuestos a antibióticos incluyeron la disminución de *B. longum* y *Bifidobacterium*, aunque también un aumento de *B. fragilis* y *B. angulatum* (el resultado sobre esta última bacteria puede ser contradictorio pero los autores (14) explican que esta bacteria puede ser muy sensible a muchos otros factores y sus cambios pueden no ser muy significativos). Otro estudio (20), encontró una relación dosis-dependiente con el aumento del riesgo de padecer EC no asociado a ningún antibiótico concreto ni una edad específica de exposición, aunque no menciona la microbiota como posible explicación a este hallazgo. Por último, tan solo uno de los estudios encontrados (18) no revela una asociación estadísticamente significativa entre los antibióticos y el aumento del riesgo de padecer EC.

Por otro lado, la información encontrada sobre la **implicación de diferentes bacterias en el metabolismo del gluten** sugiere un papel importante de estas, bien sea aumentando o disminuyendo la inmunogenicidad de los péptidos del gluten. En las

muestras de los pacientes celíacos se ha aislado un mayor número de patógenos oportunistas, como *P. aureginosa* cuya elastasa es capaz de potenciar la inflamación inducida por el gluten en el intestino. El papel perjudicial de los patógenos oportunistas sobre la respuesta inmunitaria contra el gluten se ve apoyado por el estudio en modelos animales (22) en el que la colonización intestinal en ratones libres de gérmenes con una microbiota sin estos microorganismos previene las alteraciones características de la EC (aumento de linfocitos intraepiteliales, marcadores de citotoxicidad intraepitelial, anticuerpos específicos y respuesta proinflamatoria mediada por células T), y por la demostración de que los patógenos oportunistas concretos como *E. coli* enteroadherente puede empeorar la inmunopatología producida por el gluten. Además, en uno de los estudios (24) se confirma que en el intestino humano existen bacterias capaces de degradar el gluten, aunque no encuentra diferencias entre la microbiota de los diferentes grupos diagnósticos. Sin embargo, otros autores (7) que si encuentran una capacidad reducida para degradar el gluten en el intestino de los pacientes con EC. Además, es interesante que el filo con capacidad de hidrolizar el gluten aislado con mayor frecuencia sea *Firmicutes* (que es el género más frecuente en la microbiota sana y es el que suele estar disminuido en pacientes celíacos), principalmente el género *Lactobacillus*, que es una de las familias bacterianas que se está investigando como posible probiótico.

Por último, los resultados sobre el uso de los **probióticos** como terapia complementaria a la DSG son prometedores. Los estudios encontrados sobre la administración *B. breve* y *B. longum* a pacientes celíacos tratados con DSG muestran un restablecimiento parcial de las alteraciones de la microbiota y una disminución en algunos de los marcadores de inflamación intestinal. Además, se ha encontrado que *B. infantis* es capaz de disminuir la expresión de α -defensina-5 de forma independiente a la DSG. Esta defensina suele estar aumentada en pacientes con EC activa, probablemente por la metaplasia producida en las células de Paneth en estos pacientes. Estos hallazgos sugieren que los probióticos pueden ayudar a mejorar la salud en pacientes celíacos por sus efectos beneficiosos complementarios o independientes a la DSG y por la capacidad de disminuir la inflamación intestinal y las alteraciones de la microbiota resistentes al tratamiento dietético.

9. CONCLUSIONES

Para concluir, podemos confirmar que los factores recogidos en esta revisión (la genética del huésped, el tipo de parto, la dieta y la exposición a antibióticos) tienen capacidad de alterar la microbiota intestinal.

Por un lado, no podemos confirmar que algunos de estos factores como la genética o la lactancia artificial aumenten el riesgo de padecer enfermedad celíaca, pero sí favorecen la presencia de bacterias potencialmente patógenas o que suelen estar presentes en menor cantidad en individuos sanos en comparación con pacientes celíacos. En cuanto a la dieta sin gluten, los resultados de los estudios recogidos en este trabajo señalan que esta dieta puede inducir alteraciones perjudiciales en la microbiota intestinal en individuos sanos.

Por otro lado, se ha encontrado una relación bastante consistente entre la exposición a antibióticos sistémicos y en nacimiento por cesárea con el posterior desarrollo de la enfermedad celíaca. En cuanto a los antibióticos, la relación más fuerte se ha encontrado con las quinolonas, las cefalosporinas y algunos tipos de penicilinas. Además, parece haber una relación dosis-dependiente, es decir, existe un mayor riesgo cuanto mayor es el número de antibióticos y cursos de tratamiento empleados. La relación encontrada con el nacimiento por cesárea se debe a la ausencia de exposición del recién nacido a las bacterias beneficiosas presentes en el canal del parto como *Bifidobacterium*.

Por último, podemos confirmar que la microbiota intestinal tiene un papel importante en la degradación del gluten. Las bacterias aisladas en mayor cantidad capaces de hidrolizar el gluten pertenecen al filo más abundante en la microbiota sana, que precisamente es el que suele estar disminuido en los pacientes celíacos. Además, la presencia de bacterias oportunistas o potencialmente patógenas en el intestino puede potenciar la inmunogenicidad de los péptidos del gluten, de forma que al degradar parcialmente esta proteína junto con el daño que causan estas bacterias *per se* en el intestino se activa la respuesta inmune. El estudio de las bacterias capaces de degradar el gluten ha permitido identificar algunas de ellas con la finalidad de administrarlas en forma de probiótico. Algunos compuestos de diferentes cepas de *Bifidobacterium* han confirmado su papel beneficioso como probiótico para reestablecer parcialmente el equilibrio de la microbiota intestinal en pacientes celíacos y disminuir los niveles de inflamación inducida por el gluten. Por otro lado, las bacterias del género *Lactobacillus* suponen también una vía de investigación prometedora, ya que se ha demostrado que tienen capacidad para hidrolizar el gluten, y podrían utilizarse en estrategias terapéuticas dirigidas a la eliminación de péptidos inmunogénicos del mismo.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med.* 2019; 17(1): 142.
2. Koning F. Celiac Disease: Caught Between a Rock and a Hard Place. *Gastroenterology.* 2005; 129(4): 1294-1301.
3. Kupfer SS, Jabri B. Celiac Disease Pathophysiology. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012; 22(4): 639-660.
4. Yap YA, Mariño E. An Insight Into the Intestinal Web of Mucosal Immunity, Microbiota, and Diet in Inflammation. *Front Immunol.* 2018; 9: 2617.
5. McLean MH, Dieguez D, Miller LM, Young HA. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? *Gut.* 2015; 64(2): 332-341.
6. Nouvenne A, Ticinesi A, Tana C, Prati B, Catania P, Miraglia C, et al. Digestive disorders and Intestinal microbiota. *Acta Biomed.* 2018; 89(9-S): 47-51.
7. Bodkhe R, Shetty SA, Dhotre DP, Verma AK, Bhatia K, Mishra A, et al. Comparison of Small Gut and Whole Gut Microbiota of First-Degree Relatives With Adult Celiac Disease Patients and Controls. *Front Microbiol.* 2019; 10: 164.
8. Sellitto M, Bai G, Serena G, Fricke WF, Sturgeon C, Gajer P, et al. Proof of Concept of Microbiome-Metabolome Analysis and Delayed Gluten Exposure on Celiac Disease Autoimmunity in Genetically At-Risk Infants. *PLoS One.* 2012; 7(3): e33387.
9. Olivares M, Walker AW, Capilla A, Benítez-Páez A, Palau F, Parkhill J, et al. Gut microbiota trajectory in early life may predict development of celiac disease. *Microbiome.* 2018; 6(1): 36.
10. Olivares M, Benítez-Páez A, de Palma G, Capilla A, Nova E, Castillejo G, et al. Increased prevalence of pathogenic bacteria in the gut microbiota of infants at risk of developing celiac disease: The PROFICEL study. *Gut Microbes.* 2018; 9(6): 551-558.
11. Rintala A, Riihonen I, Toivonen A, Pietilä S, Munukka E, Pursiheimo J-P, et al. Early fecal microbiota composition in children who later develop celiac disease and associated autoimmunity. *Scand J Gastroenterol.* 2018; 53(4): 403-409.
12. Koletzko S, Lee H-S, Beyerlein A, Aronsson CA, Hummel M, Liu E, et al. Caesarean section on the risk of celiac disease in the offspring: the teddy study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018; 66(3): 417-424.
13. Namatovu F, Olsson C, Lindkvist M, Myléus A, Högberg U, Ivarsson A, et al. Maternal and perinatal conditions and the risk of developing celiac disease during childhood. *BMC Pediatr.* 2016; 16: 77.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4897811/>
14. Pozo-Rubio T, de Palma G, Mujico JR, Olivares M, Marcos A, Acuña MD et al. Influence of early environmental factors on lymphocyte subsets and gut microbiota in infants at risk of celiac disease; the PROFICEL study. *Nutr Hosp.* 2013; 28(2): 464-473.
15. Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes.* 2010; 1(3): 135-137.
16. Bonder MJ, Tigchelaar EF, Cai X, Trynka G, Cenit MC, Hrdlickova B, et al. The influence of a short-term gluten-free diet on the human gut microbiome. *Genome Med.* 2016; 8(1): 45.
17. Mårild K, Ye W, Lebwohl B, Green PH, Blaser MJ, Card T, et al. Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: a nationwide case-control study. *BMC Gastroenterol.* 2013; 13: 109.
18. Mårild K, Ludvigsson J, Sanz Y, Ludvigsson JF. Antibiotic exposure in pregnancy and risk of coeliac disease in offspring: a cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14: 75.
19. Pallav K, Dowd SE, Villafuerte J, Yang X, Kabbani T, Hansen J, et al. Effects of polysaccharopeptide from *Trametes Versicolor* and amoxicillin on the gut microbiome of healthy volunteers: A randomized clinical trial. *Gut Microbes.* 2014; 5(4): 458-467.
20. Dydensborg Sander S, Nybo Andersen AM, Murray JA, Karlstad Ø, Husby S,

- Størdal K. Association Between Antibiotics in the First Year of Life and Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2019; 156(8): 2217-2229.
21. Canova C, Zabeo V, Pitter G, Romor P, Baldovin T, Zanotti R, et al. Association of Maternal Education, Early Infections, and Antibiotic Use With Celiac Disease: A Population-Based Birth Cohort Study in Northeastern Italy. *Am J Epidemiol*. 2014; 180(1): 76-85.
 22. 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(11): 2969-2982.
 23. Caminero A, McCarville JL, Galipeau HJ, Deraison C, Bernier SP, Constante M, et al. Duodenal bacterial proteolytic activity determines sensitivity to dietary antigen through protease-activated receptor-2. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 1198.
 24. Herrán AR, Pérez-Andrés 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): 673-684.
 25. Quagliarello A, Aloisio I, Bozzi Cionci N, Luiselli D, D'Auria G, Martinez-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; 8(10): 135-137.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5084046/>
 26. Klemenak M, Dolinšek J, Langerholc T, Di Gioia D, Mičetić-Turk D. Administration of *Bifidobacterium breve* Decreases the Production of TNF- α in Children with Celiac Disease. *Dig Dis Sci*. 2015; 60(11): 3386-3392.
 27. 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. *British Journal of Nutrition*. 2014; 112(1): 30-40.
 28. Pinto-Sánchez MI, Smecuol EC, Temprano MP, Suai E, González A, Moreno M, et al. *Bifidobacterium infantis* NLS Super Strain Reduces the Expression of α -Defensin-5, a marker of Innate Immunity, in the Mucosa of Active Celiac Disease Patients. *J Clin Gastroenterol*. 2017; 51(9): 814-817.
 29. Lorenzo Pistarello MJ, Vintiñi EO, González SN, Pagani F, Medina MS, et al. Decrease in lactobacilli in the intestinal microbiota of celiac children with a gluten-free diet, and selection of potentially probiotic strains. *Can J Microbiol*. 2015; 61(1): 32-37.
 30. Chander AM, Yadav H, Jain S, Bhadada SK, Dhawan DK. Cross-Talk Between Gluten, Intestinal Microbiota and Intestinal Mucosa in Celiac Disease: Recent Advances and Basis of Autoimmunity. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2597.
 31. Pozo-Rubio T, Olivares M, Nova E, De Palma G, Mujico JR, Ferrer MD, et al. Immune Development and Intestinal Microbiota in Celiac Disease. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 654143.
 32. Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 12(9): 497-506.
 33. Cenit MC, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution? *Nutrients*. 2015; 7(8): 6900-23.
 34. Giancchetti E, Fierabracci A. Recent Advances on Microbiota Involvement in the Pathogenesis of Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(2): 283.
 35. Kumbhare SV, Patangia DVV, Patil RH, Shouche YS, Patil NP. Factors influencing the gut microbiome in children: from infancy to childhood. *J Biosci*. 2019; 44(2): 49.
 36. Krishnareddy S. The Microbiome in Celiac Disease. *Gastroenterol Clin N Am*. 2019; 48(1): 115-126.
 37. Galipeau HJ, Verdu EF. Gut microbes and adverse food reactions: Focus on gluten related disorders. *Gut Microbes*. 2014; 5(5): 594-605

11. ANEXOS

ANEXO 1: Tabla sobre la relación entre tipo de estudios encontrados con los temas tratados.

	Observacionales	Experimentales	Modelos animales	Total
Genética	5	0	0	5
Parto	3	0	0	3
Dieta	1	3	0	3
Antibióticos	5	1	1	7
Metabolismo	2	0	2	4
Probióticos	0	5	0	5

ANEXO 2: Tabla-resumen de los resultados que responden al objetivo principal del trabajo.

	Cambios producidos en la microbiota	Argumentos a favor de la influencia en EC	Argumentos en contra de la influencia en EC
Genética	Portadores: ↓ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Barnesiella</i> y <i>Akkermansia</i> y ↑ <i>Enterococcus</i> , <i>ECET</i> , <i>C. difficile</i> . No portadores: ↑ TNF- α , <i>B. longum</i> y <i>Firmicutes</i> .	No ↑ de la diversidad en la microbiota de los niños con EC. No estabilización de la microbiota a los 2 años.	No se encuentran diferencias significativas entre los distintos grupos. Discrepancia sobre la cantidad de <i>Firmicutes</i> y <i>B. breve</i> .
Parto	↓ <i>B. catenulatum</i> y mayor <i>B. angulatum</i> .	El nacimiento por cesárea electiva ↑ el riesgo de EC.	El estudio TEDDY no encuentra asociación.

Dieta	DSG: ↓ de <i>Bifidobacterium</i> , <i>B. longum</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Veillonellaceae</i> . LA: ↑ <i>C. Perfringens</i> y <i>C. Difficile</i> LM: ↑ <i>C. Difficile</i>	DSG: ↓ citosinas antiinflamatorias: IL-10.	DSG: ↓ citosinas proinflamatorias: TNFα, IFNγ e IL-8
Antibióticos	↓ de <i>B. longum</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp. Amoxicilina en sanos: ↑ <i>Escherichia/Shigella</i>	Quinolonas Cefalosporinas de 3ª y 4ª generación. Penicilinas de espectro ampliado Relación dosis dependiente	Uno de los artículos no encuentra asociación.

ANEXO 3: Tabla sobre la Odds Ratio para el uso previo de antibióticos en individuos con enfermedad celíaca (17).

	Coeliac disease			
	Cases n = 2,933 (%)	Controls n = 14,571 (%)	Odds ratio	95% CI
Type of antibiotics used^b				
Penicillin V	291 (9.9)	1308 (9.0)	1.12	0.98 – 1.27
Extended spectrum penicillins	183 (6.2)	657 (4.5)	1.38	1.18 – 1.63
Quinolones	51 (1.7)	170 (1.2)	1.46	1.08 – 1.97
Macrolides	53 (1.8)	180 (1.2)	1.44	1.07 – 1.93
Other systemic antibiotics	291 (9.9)	1041 (7.1)	1.42	1.24 – 1.62
Antibiotic use in the last year preceding diagnosis/study entry				
Any antibiotic	722 (24.6)	2730 (18.7)	1.42	1.29 - 1.56
Penicillin V	259 (8.8)	1162 (8.0)	1.12	0.97 - 1.28
Extended spectrum penicillins	166 (5.7)	559 (3.8)	1.46	1.23 - 1.74
Quinolones	45 (1.5)	153 (1.1)	1.43	1.04 - 1.98
Macrolides	48 (1.6)	150 (1.0)	1.55	1.13 - 2.11
Other systemic antibiotics	206 (8.9)	905 (6.2)	1.47	1.26 - 1.66

ANEXO 4: Tabla sobre la asociación entre el uso de antibióticos en el primer año de vida y enfermedad celiaca (21).

Class of Antibiotics (ATC Classification System Code)	Total No. of CD Cases (n = 721)	No. of PR CD Cases ^b (n = 510)	Person- Years of Follow-up	IRR for All CD Cases ^c	95% CI	IRR for PR CD Cases ^{b,c}	95% CI
Any antibiotic (J01)							
No	385	264	651,492	1		1	
Yes	336	246	479,793	1.24 ^d	1.07, 1.43	1.31 ^d	1.10, 1.56
No. of courses (any antibiotic)							
0	385	264	651,492	1		1	
1–2	243	175	372,838	1.14	0.97, 1.34	1.19	0.99, 1.45
3–4	58	44	79,562	1.31	1.00, 1.73	1.44 ^d	1.05, 1.98
≥5	35	27	27,393	2.39 ^d	1.69, 3.38	2.66 ^d	1.79, 3.95
Penicillins (J01C)							
No	489	338	797,556	1		1	
Yes	232	172	333,729	1.15	0.98, 1.35	1.24 ^d	1.03, 1.49
Cephalosporins (J01D)							
No	592	413	970,712	1		1	
Yes	129	97	160,573	1.42 ^d	1.18, 1.73	1.51 ^d	1.21, 1.89
First- and second- generation cephalosporins (J01DB–J01DC)							
No	637	447	1,022,217	1		1	
Yes	84	63	109,069	1.39 ^d	1.11, 1.76	1.44 ^d	1.10, 1.89
Third- and fourth- generation cephalosporins (J01DD–J01DE)							
No	663	468	1,067,918	1		1	
Yes	58	42	63,367	1.49 ^d	1.14, 1.95	1.52 ^d	1.11, 2.09
Macrolides (J01F)							
No	638	452	1,010,635	1		1	
Yes	83	58	120,650	1.16	0.92, 1.46	1.13	0.86, 1.49

Abbreviations: ATC, Anatomical-Therapeutic-Chemical; CD, celiac disease; IRR, incidence rate ratio; PR, pathology report.

^a Analyses were restricted to children born after 1995 (drug prescription records were available only from 1995 onward).

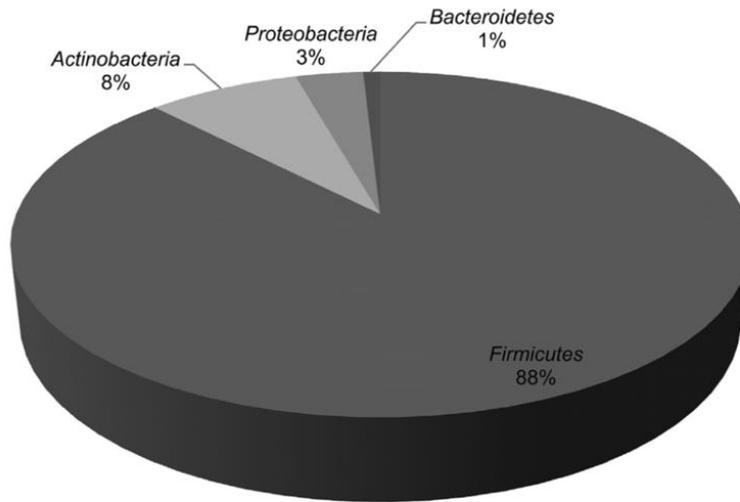
^b Restricted to cases with a pathology report confirming CD.

^c Adjusted for sex and year of birth.

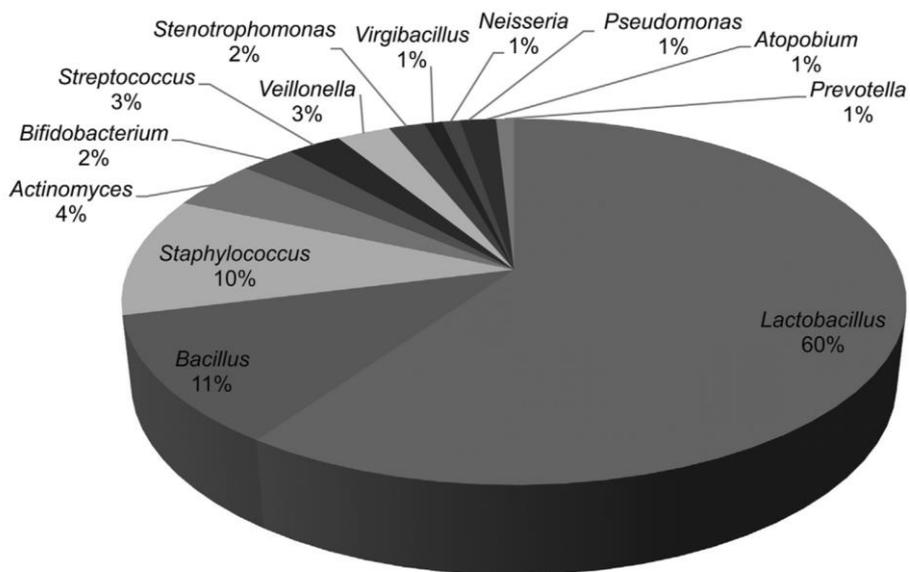
^d $P < 0.05$.

ANEXO 5: Diversidad bacteriana de las muestras duodenales cultivada en el medio con gluten (24).

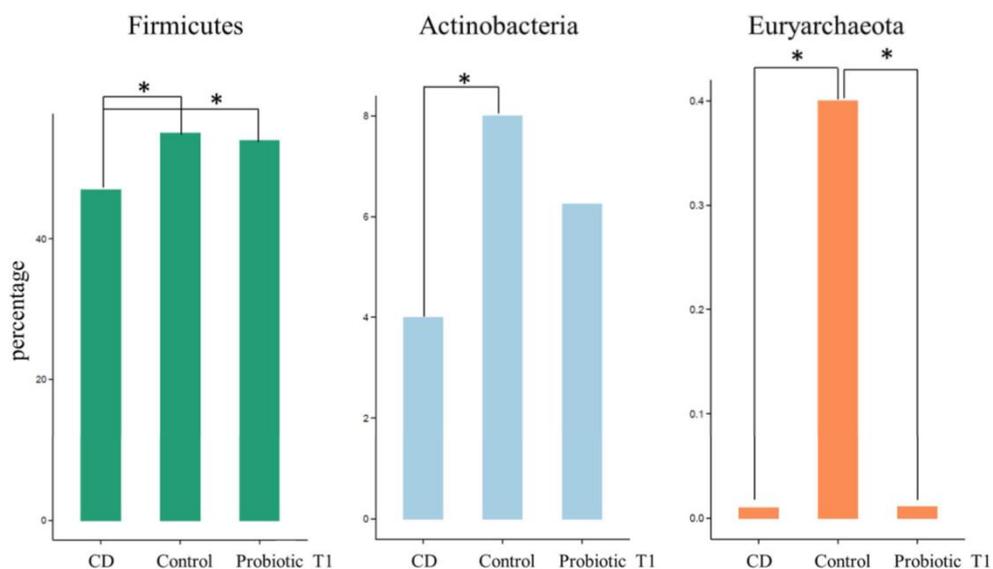
A. Clasificada por filo



B. Clasificada por género



ANEXO 6: Gráfica sobre la abundancia relativa de los 3 tipos de bacterias estudiados en los diferentes grupos diagnósticos antes y después de la administración del probiótico compuesto por *B. breve*. (25)



ANEXO 7: Tabla de los resultados del estudio sobre la administración de *B. infantis*. (28)

Characteristics	CD Active No Treatment	CD Active <i>Bifidobacterium infantis</i>	CD 1 y GFD	P
N	24	12	5	
Age [median (IQR)]	40 (29-54)	41 (22-53)	35 (31-45)	0.74
Female [n (%)]	23 (95.8)	8 (67)	4 (80)	0.11
Serology [median (IQR)]				
IgA TG	129 (104-200)	200 (192-216)	8 (4-17)	
IgA DGP	200 (120-300)	152 (64-300)	7 (4-18)	
IgG DGP	82 (39-149)	200 (182-207)	7 (2-20)	
Histology (Marsh classification) (N)				
0	0	0	1	
1	0	0	1	
2	0	0	3	
IIIa	4	0	0	
IIIb	4	0	0	
IIIc	16	12	0	
A-HD-5 [median (IQR)]	2.5 (1.4-3.2)	0.84 (0.33-1.72)	2.7 (2.2-3.2)	< 0.001
Macrophage [median (IQR)] (% area)	0.65 (0.29-1.34)	0.47 (0.27-0.78)	0.04 (0.01-0.04)	0.017
Paneth cells [median (IQR)] (avg × crypt)	2.0 (1.6-2.6)	1.62 (1.00-2.37)	2.2 (1.9-2.6)	0.025

Expression of macrophages, Paneth cell numbers, and α -defensin-5 in duodenal biopsies.
 CD indicates celiac disease; DGP, deaminated gliadin peptides; GFD, gluten-free diet; HD-5, human α -defensin-5; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; TG, transglutaminase.

ANEXO 8: Póster para la presentación del trabajo.



Universidad de Valladolid
Facultad de Medicina

IMPLICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA ENFERMEDAD CELIACA

Autora: Lucía De La Hoz Marañón. Tutor: Eduardo Arranz Sanz.

INTRODUCCIÓN

La **enfermedad celiaca** se define como un desorden sistémico con base inmunológica causado por la ingesta de gluten en personas con predisposición genética. Se manifiesta con una combinación variable de síntomas y se caracteriza por la elevación de anticuerpos específicos en sangre y por una lesión histológica en la mucosa duodenal variable.

Su prevalencia oscila entre el 1% y el 2% aproximadamente. Más de un tercio de la población general europea es portadora del componente genético predisponente; sin embargo, tan solo un pequeño porcentaje desarrolla la enfermedad, lo que sugiere la existencia de otros factores ambientales implicados en la patogénesis. Un campo emergente en la investigación sobre los factores desencadenantes es la **microbiota intestinal**. Durante los primeros años de vida, varios factores podrían influir en la selección de los diferentes microorganismos: la genética del huésped, la dieta (lactancia materna o artificial), la exposición a antibióticos, el tipo de parto (por cesárea o vaginal) y las infecciones intestinales.



RESULTADOS

	Cambios producidos en la microbiota	Argumentos a favor de la influencia en EC	Argumentos en contra de la influencia en EC
Genética	Portadores: ↓ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Barnesiella</i> y <i>Akkermansia</i> y ↑ <i>Enterococcus</i> , <i>ECET</i> , <i>C. difficile</i> . No portadores: ↑ TNF-α, <i>B. longum</i> y <i>Firmicutes</i> .	No ↑ de la diversidad en la microbiota de los niños con EC. No estabilización de la microbiota a los 2 años.	No se encuentran diferencias significativas entre los distintos grupos. Discrepancia sobre la cantidad de <i>Firmicutes</i> y <i>B. breve</i> .
Parto	↓ <i>B. catenulatum</i> y mayor <i>B. angulatum</i> .	El nacimiento por cesárea electiva ↑ el riesgo de EC.	El estudio TEDDY no encuentra asociación.
Dieta	DSG: ↓ de <i>Bifidobacterium</i> , <i>B. longum</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Veillonellaceae</i> . LA: ↑ <i>C. Perfringens</i> y <i>C. Difficile</i> LM: ↑ <i>C. Difficile</i>	DSG: ↓ citosinas antiinflamatorias: IL-10.	DSG: ↓ citosinas proinflamatorias: TNFα, IFNγ e IL-8.
Antibióticos	↓ de <i>B. longum</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp. Amoxicilina en sanos: ↑ <i>Escherichia/Shigella</i>	Quinolonas Cefalosporinas de 3ª y 4ª generación. Penicilinas de espectro ampliado Relación dosis dependiente	Uno de los artículos no encuentra asociación.

EC: enfermedad celiaca; DSG: dieta sin gluten; LA: lactancia artificial; LM: lactancia materna; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; IFNγ: interferón gamma; IL: interleucina.

Papel de las bacterias en el metabolismo del gluten:

En el intestino humano existen bacterias capaces de metabolizar o degradar las proteínas del gluten:



- Actividad peptidolítica frente al péptido 33-mer (péptido más inmunogénico para los pacientes con enfermedad celiaca).
- Actividad proteolítica extracelular como los patógenos oportunistas.

En modelos animales, *P. aureginosa* es capaz de producir una elastasa que empeora la inflamación producida por el gluten.

Se demuestra una reducción de la capacidad de la degradación del gluten en pacientes celiacos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

- ✓ Factores como la genética del huésped, el tipo de parto, la dieta y la exposición a antibióticos tienen capacidad para alterar la microbiota intestinal.
- ✓ Solo la exposición a antibióticos y el nacimiento por cesárea han demostrado aumentar el riesgo de padecer la enfermedad celiaca.
- ✓ La dieta sin gluten puede inducir cambios perjudiciales en la microbiota intestinal de los individuos sanos.
- ✓ Se ha demostrado que el intestino humano contiene bacterias con la capacidad de metabolizar o degradar las proteínas del gluten.
- ✓ La administración de probióticos basados en bacterias como *Bifidobacterium*, deficitarias en los pacientes celiacos, han mostrado claros beneficios.

MÉTODOS

Se ha realizado una revisión sistemática con la finalidad de recopilar la evidencia científica disponible sobre cambios en la microbiota intestinal y su papel en la patogénesis de la enfermedad celiaca. Se ha utilizado "PubMed" como base de datos principal y las siguientes palabras clave: "celiac disease", "microbiota", "microbiome", "cesarean section", "antibiotic", "probiotic". Utilizando como filtros estudios y ensayos clínicos publicados en los últimos 10 años, se obtuvo un total de 67 artículos de los que finalmente se seleccionaron 24.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es:

- ✓ Conocer los posibles factores capaces de inducir modificaciones en la microbiota intestinal como desencadenante de la enfermedad celiaca.

Como **objetivos secundarios** se incluyen:

- ✓ Confirmar el papel patogénico o protector de las principales bacterias de la microbiota intestinal en relación con la enfermedad celiaca.
- ✓ Valorar la posible utilidad de los probióticos como terapia complementaria a la dieta sin gluten.

Probióticos como tratamiento complementario a la DSG:

Bifidobacterium breve:

