

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

ALIMENTARIAMASTER UNIVERSITARIO EN

BIOTECNOLOGÍA

**“Detección de respuestas inmunológicas
anómalas contra bacterias intestinales en
individuos con Lupus Eritematoso
Sistémico”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

Lei Wang

JUNIO, 2014



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor del Proyecto Abelardo por darme la oportunidad de realizar este trabajo con ellos, y gracias a mi supervisora Arancha que me acompañaba por casi cinco meses, en el Grupo de Probióticos y Prebióticos del Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos del IPLA-CSIC, en Villaviciosa.

Gracias a Arancha desde mi corazón, que me enseñó tanto las técnicas de práctica como los conocimientos útiles. Gracias especialmente a ella por ayudarme mi castellano en este trabajo, no puedo llevar a buen término mi trabajo sin ella.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, tanto becarios como técnicos, que me ayudaron a integrarme y sentirme una más en el grupo.

Agradezco al coordinador del Master Manuel Rendueles de la Vega, que me supuso una gran ayuda durante todo el curso. Y mi tutor de la universidad Sonia, gracias por darme la oportunidad a trabajar con ella.

Sobre todo, gracias a mis padres por apoyarme a estudiar fuera de mi país y animarme en los malos momentos.

Además, gracias a mis compañeros del Master, que siempre me ayudan tanto en la clase como la vida. Mucho gusto en conocerlos, que suerte tuve por venir a España.

Detección de respuestas inmunológicas anómalas contra bacterias intestinales en individuos con Lupus Eritematoso Sistémico

RESUMEN.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Microbiota intestinal.....	10
1.2 Enfermedades autoinmunes (EA) y Lupus Eritematoso Sistémico (LES).....	12
1.3 Objetivo de proyecto.....	14
2. CONSIDERACIONES TEORICAS.....	15
2.1 Antecedentes.....	15
2.2. Microbiota.....	17
2.2.1. Composición de la microbiota intestinal.....	17
2.2.2. Evaluación de la microbiota intestinal.....	18
2.3. El LES es una enfermedad autoinmune con origen multifactorial.....	20
2.3.1. Disfunciones del sistema inmune.....	20
2.3.2. Factores genéticos.....	21
2.3.3. Factores ambientales.....	23
2.3.4. Factores hormonales.....	23
2.4. Biomarcadores.....	23
2.5. Anticuerpo y autoanticuerpo.....	25
2.6. Electro-transferencia de proteínas y Western Blot.....	28
3. MATERIAL Y METODOS.....	32
3.1. Preparación de las muestras y extracción de las proteínas.....	32
3.2. Condiciones de cultivo y cepas utilizadas.....	33
3.3. Extracción de proteína de microbiota fecal y cuantificación.....	35
3.4. SDS-PAGE y Western Blot.....	38
3.4.1. Elaboración de los geles de SDS- PAGE.....	38
3.4.2. Procedimiento de separación de proteínas:.....	39
3.4.3. Análisis de las proteínas mediante Western Blot.....	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1 Cuantificación de los extractos de las proteínas.....	43
4.1.1. Cuantificación de las proteínas de microbiota.....	43
4.1.2. Crecimiento e identificación de los microorganismos.....	45
4.1.3. Cuantificación de las proteínas intracelulares bacterianas.....	47
4.2. Electroforesis de proteínas.....	48
4.3. Resultados de los análisis mediante Western Blot.....	51
4.3.1 Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota. Detección de IgG..	51
4.3.2. Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota. Detección de IgA.	53
4.3.3. Western blot reactividad de proteínas bacterianas y de microbiota con sueros individuales.....	54

4.3.4. Western blot reactividad de proteínas de microbiota con sueros individuales	57
5. CONCLUSIÓN.....	61
6. BIBLIOGRAFÍA.....	62

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica de etiología no precisada, caracterizada por daño de naturaleza inmunológica en los diferentes órganos; también es una enfermedad de distribución mundial, afectando a todas las razas y poblaciones estudiadas, aunque no con la misma frecuencia. Las importantes variaciones interpopulacionales descritas, tanto en la frecuencia de aparición de la enfermedad como en sus principales características clínicas e inmunológicas, están posiblemente relacionadas con la existencia de distintos factores genéticos y ambientales. De acuerdo con los trabajos existentes en la bibliografía, sabemos que la microbiota intestinal puede jugar un papel importante en el LES, aunque no se sabe si su participación es como causa o como consecuencia de la misma.

El objetivo de este proyecto es la extracción, separación e identificación de proteínas bacterianas del tracto gastrointestinal que puedan ser seleccionadas como potenciales biomarcadores que permitan diferenciar individuos con LES de individuos sanos.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease of unknown etiology, characterized by immunological damage in different organs. It is a worldwide disease, affecting all races and populations, although not with the same frequency. Significant interpopulation variations described in both the frequency of occurrence of the disease and its main clinical and immunological characteristics, are possibly related to the existence of different genetic and environmental factors. According to previous work, we know that the intestinal microbiota could play an important role in SLE, although it is unclear if their participation is as a cause or as a result of it.

Therefore, the objective of this project is the extraction, separation and identification of bacterial proteins from the microbiota of the gastrointestinal tract as potential biomarkers allowing the differentiation of individuals with SLE from healthy individuals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cronología de la investigación con biomarcadores y de su posterior traslado a la clínica. Pag. 25.

Figura 2: Microfotografía de un preparado obtenido por IFI de células tumorales de línea HEp-2 expuestas a suero de un paciente con LES (anticuerpos primarios) y luego marcado con un anticuerpo secundario de ratón Anti-humana-IgG. Pag. 28.

Figura 3: Ejemplo del procedimiento para llevar a cabo SDS-PAGE con un gel de separación de 12.5% y un gel de empaquetamiento del 5%. Pag. 29.

Figura 4: Montaje del sándwich en la cubeta de electroforesis. Pag. 30.

Figura 5: Esquema de la interacción entre el antígeno, el anticuerpo primario y el secundario unido a HRP. Pag. 31.

Figura 6: Patrón 1 de la concentración de proteína (método de BCA, grupo LS). Pag. 43.

Figura 7: Patrón 2 de la concentración de proteína (método de BCA, grupo HD). Pag. 44.

Figura 8: Electroforesis con gel de agarosa. Pag. 46.

Figura 9: Resultado de la secuenciación parcial del gen ARN16S de *Bacteroides*. Pag. 46.

Figura 10: Resultado de la secuenciación parcial del gen ARN16S de *Blautia*. Pag. 47.

Figura 11: Resultado de la secuenciación parcial del gen ARN16S de *Ruminococcus*. Pag. 47.

Figura 12: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las muestras individuales HD4, HD6, HD8, HD13, HD14, HD16, LS5, LS15. Pag. 48.

Figura 13: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las muestras individuales HD19, HD20, HD21, HD22, HD30, HD32, HD33, LS13. Pag. 49.

Figura 14: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las muestras de proteína individuales LS14, LS15, LS5, HD8, HD22, HD6, LS13. Pag. 50.

Figura 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las proteínas bacterianas y pool de proteína de microbiota (mezcla con 10µg de cada muestra). Pag. 50.

Figura 16: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota (detección IgG, anticuerpo primario: Suero HD pool). Pag. 51.

Figura 17: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota (detección IgG, anticuerpo primario: Suero LS pool). Pag. 52.

Figura 18: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota (detección Ig-A, anticuerpo primario: suero HD pool). Pag. 53.

Figura 19: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota (detección Ig-A, anticuerpo primario: suero LS pool). Pag. 53.

Figura 20: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota a suero LS2. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 55.

Figura 21: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota a suero LS21. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 55.

Figura 22: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota a suero HD4. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 56.

Figura 23: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota a suero HD26. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 56.

Figura 24: Western blot de proteínas de microbiota a sueros de HD6, HD8, HD11. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 57.

Figura 25: Western blot de proteínas de microbiota a sueros de LS11, LS1, LS12. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 57.

Figura 26: Western blot de proteínas de microbiota a sueros de HD20, HD21, HD22. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 58.

Figura 27: Western blot de proteínas de microbiota a sueros de LS14, LS15, LS18. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 58.

Figura 28: Western blot de proteínas de microbiota a sueros de LS6, LS7, LS13. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 59.

Figura 29: Western blot de proteínas de microbiota a sueros de HD19, HD30, HD32, HD33. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 59.

Figura 30: Western blot de proteínas de microbiota a sueros de HD28, HD29, LS5, LS26. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500. Pag. 60.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición de la microbiota global en muestras fecales de controles sanos (HD) y de lupus (LS) a nivel filo y nivel familia. Pag. 16.

Tabla 2: Códigos de las muestras analizadas en este trabajo. Pag. 32.

Tabla 3: Composición de cuatro geles de poliacrilamida. Pag. 38.

Tabla 4: Concentración de proteína por el método de BCA (grupo LS). Pag. 44.

Tabla 5: Concentración de proteína por el método de BCA (grupo HD). Pag. 45.

Tabla 6: Densidad óptica a la que se crecieron los microorganismos. OD 600 nm de las bacterias. Pag. 45.

Tabla 7: Concentraciones de las proteínas bacterianas por los métodos de LOWRY y BCA. Pag. 48.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

Ag: antígeno

ANA: anticuerpos antinucleares

APS: persulfato de amonio

BCA: ácido bicinconínico

Cadena H: cadena pesada de la inmunoglobulina

Cadena L: cadena ligera de la inmunoglobulina

CAPS: ácido N-ciclohexil-3-aminopropanesulfónico

EA: enfermedades autoinmunes

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

Fc γ R: el receptor Fc de las inmunoglobulinas

HRP: peroxidasa de rábano

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFN- α : interferón alfa

IgA: inmunoglobulina A

IgG: inmunoglobulina G

IL-10: interleuquina 10

LB: linfocitos B

LEC: lupus eritematoso cutáneo

LED: lupus eritematoso discoide

LN: lupus neonatal

LT: linfocitos T

MALT: tejido linfoide asociado a mucosas

MRS: de Man, Rogosa y Sharpe

NIPC: células productoras de IFN naturales

PBS: *buffer* fosfato salino

PBST: *buffer* fosfato salino-Tween

PBST-L: *buffer* fosfato salino-Tween 20 con leche desnatada

PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PVDF: polifluoruro de vinilideno
SCLE: lupus eritematoso cutáneo subagudo
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SLE: systemic lupus erythematosus
TCA: ácido tricloroacético
TCR: receptor de la célula T
TR: linfocitos T reguladores
V_H: región variable de la cadena H de la inmunoglobulina
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
V_L: región variable de la cadena L de la inmunoglobulina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microbiota intestinal

El término «microflora» o «microbiota» hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos de un nicho ecológico determinado. Si hablamos del ser humano, la microbiota presente en el intestino constituye aproximadamente un tercio del peso seco de las heces. El término microbiota intestinal normal hace referencia a las especies microbianas que, de forma habitual, se encuentran en individuos sanos. El conjunto de genes presentes en la microbiota se denomina microbioma.

Muchos de los microorganismos que habitan en el intestino humano forman la microbiota nativa o indígena, porque habitan de forma permanente en el tracto gastrointestinal. El individuo nace completamente estéril y adquiere su microbiota inmediatamente después del nacimiento, sobre todo de la madre y el entorno ambiental inicial. Otras bacterias son microorganismos en tránsito, ya que en la luz intestinal habitan temporalmente en la mucosa y luego desaparecen (O'Hara, et al, 2006). Estas bacterias se ingieren continuamente, principalmente a través de los alimentos y bebidas.

El intestino humano es el hogar de una gran población, diversa y dinámica, de microorganismos, de tal manera que se ha considerado que el ser humano adulto está constituido por un mayor número de células procariontas (90%) que eucariotas (10%), principalmente bacterias, pero también hongos, virus y protozoos, que se han adaptado a la vida en la superficie de las mucosas o en el lumen del intestino. La microbiota intestinal en el adulto puede variar entre grupos humanos. Muchas de las características bioquímicas y fisiológicas del hospedador están influenciadas por la presencia de microorganismos intestinales (Guarner et al. 2003).

En los últimos años se han adquirido los conocimientos suficientes para afirmar que la microbiota intestinal es un órgano en sí mismo, perfectamente integrado en la fisiología del individuo. Tubo digestivo y microbiota son interdependientes y hay evidencias que sugieren que su equilibrio condiciona la homeostasis del individuo dentro de su entorno ambiental. La microbiota, mantiene una relación simbiótica tanto

de tipo comensal como mutualista con el hospedador. La mayoría de este conjunto de bacterias no son dañinas para la salud, y muchas son beneficiosas, participando en numerosos procesos fisiológicos (Draganov et al, 2009). Se calcula que el ser humano tiene en su interior unas 2.000 especies bacterianas diferentes, de las cuales solamente 100 pueden llegar a ser perjudiciales.

El tracto gastrointestinal y en particular el intestino, hospeda a una extensa y diversa microbiota, con más de 10^{12} bacterias por gramo de contenido, por lo que la microbiota intestinal tiene gran importancia médica ya que las bacterias pueden influir beneficiosamente en la salud o dañar al hospedador (Guarner et al, 2011).

A partir de datos experimentales obtenidos de estudios de colonización intestinal controlada en animales, se han identificado tres funciones principales de la microbiota intestinal (Icaza-Chávez et al, 2012):

- a) **Funciones de nutrición y metabolismo**, como resultado de la actividad bioquímica de la microbiota, incluyendo la forma de recuperación de energía de ácidos grasos de cadena corta, la producción de vitaminas y la absorción de calcio y hierro en el colon.
- b) **Funciones de protección**. Prevención de la invasión de agentes infecciosos o del crecimiento excesivo de potenciales especies patógenas.
- c) **Función trófica** sobre la proliferación y diferenciación intestinal del epitelio, y el desarrollo y la modulación del sistema inmune. En individuos genéticamente susceptibles, un desequilibrio puede dar lugar a enfermedades de trastorno inmunológico en el que el sistema inmune reacciona de forma exagerada a los antígenos microbianos no nocivos.

1.2 Enfermedades autoinmunes (EA) y Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

En ciertas circunstancias el estado de salud normal de tolerancia a lo propio puede romperse, llegándose a una autoinmunidad patológica que se diferencia de la fisiológica en que la respuesta inmune contra componentes propios ocasiona daño importante celular o tisular que puede llegar a la alteración de sus funciones, si el sistema inmunitario no ataca a las bacterias invasoras sino al propio organismo (Cervera et al, 2003).

Con la evolución de este proceso patológico aparecen síntomas y signos que caracterizan a un grupo de entidades clínicas denominadas enfermedades autoinmunes (EA). Las razones para este fallo del sistema inmunológico rara vez se puede tratar. El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica de etiología no precisada caracterizada por daño de naturaleza inmunológica en la piel, articulaciones, sistema nervioso central, riñón, huesos y vasos sanguíneos, entre otros. El nombre de lupus es de origen incierto. La palabra lupus es latín y significa lobo, y las lesiones en la cara de las personas afectadas por el lupus recuerdan una mordedura de lobo. No fue hasta 1981 que se le dio el nombre de LES, que hoy en día se considera una enfermedad compleja. El LES es una enfermedad de distribución mundial, que afecta a todas las razas y poblaciones estudiadas, aunque no con la misma frecuencia.

Los estudios epidemiológicos realizados demuestran la existencia de importantes diferencias interregionales en cuanto a la incidencia y prevalencia del LES, así como en sus principales alteraciones inmunológicas y clínicas (Tian et al, 2010). El LES puede manifestarse en cualquier sexo y a cualquier edad, pero afecta con más frecuencia a las mujeres, de forma que en el 90% de los casos son de mujeres jóvenes y de mediana edad, aunque también pueden padecerla varones, ancianos y niños. Las mujeres de color lo sufren tres veces más que las de raza blanca (Munno et al,2004).

Se calcula que en España 40 de cada 100.000 personas sufren esta enfermedad. En Asturias 8 de cada 10.000 mujeres entre 15 y 49 años tienen LES, mientras que sólo aparece en 4 de cada 100.000 varones en la misma franja de edad (García A, 2002).

El LES es mortal cuando daña órganos como cerebro, pulmones, corazón o riñones. El pronóstico ha mejorado en los últimos 3 años. La supervivencia a los 10 y 20 años es del 80% y 65% respectivamente (García A, 2002). La mortalidad temprana se asocia con la actividad de la enfermedad y la infección, mientras que la mortalidad tardía a enfermedad vascular por aterosclerosis.

La enfermedad tiene varios fenotipos: el lupus eritematoso discoide (LED), lupus neonatal (LN), lupus eritematoso cutáneo subagudo (SCLE) y una forma extendida, el lupus eritematoso sistémico (LES).

Aunque se desconoce exactamente la causa de la respuesta autoinmune en el LES, hasta la fecha hay indicios tanto de la predisposición genética como de factores infecciosos y hormonales. La enfermedad aparece con más frecuencia en algunas familias, y los gemelos tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Además, ciertos factores hereditarios pueden ser importantes; por ejemplo, un defecto en el proceso de la muerte celular programada (apoptosis) u otros defectos inmunes. El LES se produce con más frecuencia después de infecciones o exposiciones a la radiación UV, lo que hace sospechar que estos factores externos se pueden vincular al origen de la enfermedad.

Diversos estados hormonales también parecen jugar un papel en el desarrollo de LES, ya que existe una mayor incidencia observada entre las mujeres en edad fértil y, a veces, después de tomar anticonceptivos hormonales.

Por último, hay que tener en cuenta que una disbiosis intestinal o desequilibrio de especies microbianas con respecto a población sana, también se ha asociado con enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, diabetes melitus tipo 1 y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Adu et al, 2001).

1.3 Objetivo de proyecto

Cada día existe una mayor evidencia que sugiere que el mimetismo molecular como resultado de la infección viral puede contribuir al desarrollo de lupus. Además, por otro lado algunos informes han puesto de relieve que las infecciones intestinales pueden mejorar los síntomas de LES, y también que existe una marcada diferencia en la especificidad de los anticuerpos anti-ADN bacteriano en pacientes sanos y con LES. De hecho, hay datos que hablan de una composición diferente de las bacterias intestinales cultivables en el LES.

La búsqueda de nuevos biomarcadores en la microbiota humana abre un nuevo campo de posibilidades en el diagnóstico del lupus.

Tras lo expuesto anteriormente, la hipótesis de este estudio es que la microbiota intestinal juega un papel en la enfermedad del lupus, **por lo que el objetivo principal de este trabajo es el de la selección de potenciales biomarcadores proteicos bacterianos que nos permitan diferenciar individuos con LES de individuos sanos.**

2. CONSIDERACIONES TEORICAS

2.1 Antecedentes

Hasta el momento, apenas hay estudios de caracterización de la composición microbiana intestinal en humanos que padecen lupus, y la relación entre el microbioma intestinal humano y esta enfermedad no se ha establecido. En el grupo de investigación donde se desarrolla este trabajo han descrito recientemente que existe una disbiosis intestinal asociada al lupus, es decir, un desbalance en la composición microbiana que coloniza el intestino de personas con lupus con respecto a individuos sanos.

Probablemente, la disbiosis que se define en este trabajo es la consecuencia de la función inmune alterada de los pacientes con LES, y esto sugiere que se podrían aplicar diversas estrategias encaminadas a modular la microbiota intestinal de individuos con LES, por ejemplo con el empleo de microorganismos probióticos o sustratos prebióticos, y así influir en la fisiología de la enfermedad.

Durante esta investigación, se ha analizado la gente de dos grupos: pacientes con LES y controles sanos. No hay diferencias significativas entre los 2 grupos con respecto a factores que se ha visto influyen la composición microbiana intestinal, como la ingesta diaria de energía, macronutrientes, micronutrientes, fibras y fito-compuestos.

Tampoco se encontraron diferencias en factores de estilo de vida relacionados: tabaquismo, consumo de alcohol, la actividad física y el uso de suplementos de vitaminas y minerales. Estos resultados reducen la posibilidad de que el perfil microbiano se vea afectado por factores que tienen influencia en el mismo, como la edad (Claesson et al, 2012), la dieta (Wu et al, 2012), o la ingesta de compuestos fenólicos (Moco et al, 2012; Queipo-Ortuño et al, 2012).

Además, el trabajo demostró que la microbiota del grupo LES era estable e independiente de los síntomas, el tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad, la

edad al momento del diagnóstico, y la presencia de anticuerpos anti-ADN de doble cadena.

Un resumen de la composición de microorganismos para los dos grupos de individuos se muestra en esta tabla:

Nivel taxonómico	Microorganismos	% en HD	% en LS
Filo	<i>Firmicutes</i>	70,33%	58,56%
	<i>Bacteroidetes</i>	18,38%	34,26%
Familia	<i>Lachnospiraceae</i>	46,06%	39,30%
	<i>Ruminosoccaceae</i>	14,33%	12,46%

Tabla 1: Composición de la microbiota global en muestras fecales de controles sanos (HD) y de lupus (LS) a nivel filo y nivel familia.

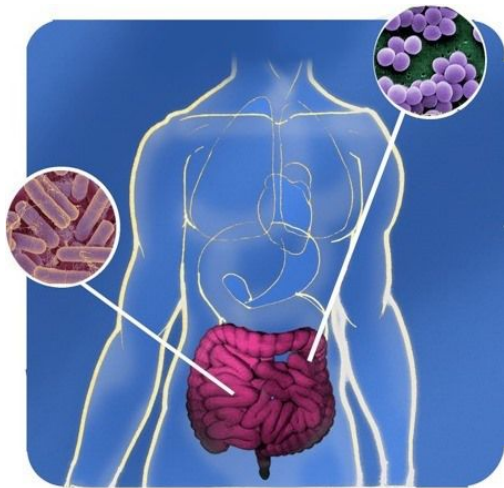
Uno de los principales resultados de este estudio fue la identificación de un disbiosis clara entre los dos grupos, que se caracteriza por una abundancia relativa superior de *Bacteroidetes* en el grupo de LES. Además, se detectó una disminución significativa en el ratio de *Firmicutes* / *Bacteroidetes* en individuos con LES. La disbiosis entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en el intestino humano ya ha sido descrita en estudios anteriores, asociada con algunos trastornos. Por ejemplo, la relación entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes* disminuye en la diabetes tipo 2 humana, en comparación con los controles (Larsen et al, 2010).

Dentro de una situación de disbiosis, se han establecido teorías sobre el potencial de la dieta para modificar este desequilibrio. Wu et al (2012) informaron que los niveles de *Firmicutes* se asociaron positivamente con una dieta baja en grasa/alta en fibra. También, intervenciones dietéticas que incluyan grano entero en la dieta pueden favorecer el crecimiento de unos microorganismos sobre otros, cambiando la relación entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

2.2. Microbiota

2.2.1. Composición de la microbiota intestinal

Los microorganismos habitan en diversas partes del cuerpo humano, incluida la piel, la nariz, la boca y el intestino. Concretamente, el intestino humano alberga una enorme cantidad de microorganismos, aproximadamente 100 trillones, sobrepasando el número de las células humanas en unas 10 veces. Los microorganismos presentes en el intestino son principalmente bacterias y pertenecen a más de 1.000 especies, el 90% de las cuales corresponden a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Cada individuo tiene una composición de microbiota intestinal distinta y muy variable a lo largo de la vida (Penders et al, 2006), aunque todas las personas comparten una serie de



microorganismos comunes básicos. El conjunto de microorganismos intestinales se denomina “microbiota” intestinal (Eckburg et al, 2005).

La microbiota humana se crea en la primera etapa de la vida. El feto en el útero es estéril y la exposición a los microorganismos empieza en el momento del nacimiento, es decir, al pasar a través del canal del parto y exponerse a los microbios presentes en el entorno. Pese a que la microbiota se instaura en la primera etapa de la vida, puede variar posteriormente según cambios de edad, dieta, ubicación geográfica, ingesta de complementos alimenticios y fármacos, además de otras influencias ambientales. El exceso de grasa corporal y las enfermedades también se asocian con una microbiota intestinal alterada (Rodrigo et al, 2009).

Se sabe que la alimentación en un momento precoz de la vida, incluyendo el periodo de lactancia o alimentación con preparados para bebés, modula la composición de la microbiota intestinal en los humanos. Asimismo, se cree que unos hábitos alimenticios específicos repercuten de manera importante en la microbiota y explican

algunas de las diferencias geográficas observadas. Otros factores, como los genes, tratamientos con antibióticos, estrés, infecciones, edad, clima, enfermedades hepáticas, renales, cáncer, obesidad, etc., influyen en el perfil de la microbiota.

2.2.2. Evaluación de la microbiota intestinal

Los microorganismos intestinales influyen en la salud de diversas maneras. Existen datos que demuestran que personas con determinadas enfermedades (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad del intestino irritable, alergia) tienen una microbiota diferente de la de las personas sanas, aunque en la mayoría de casos es imposible precisar si la microbiota alterada es una causa o una consecuencia de la enfermedad (Bengmarck, 1998).

Los microorganismos presentes en el intestino desempeñan un papel fundamental en la salud digestiva, pero también influyen en el sistema inmunitario. Los tejidos inmunitarios del tracto gastrointestinal constituyen la parte más grande y más compleja del sistema inmunitario humano. La mucosa intestinal es una gran superficie que recubre el intestino y que está expuesta a antígenos de patógenos (causantes de enfermedades) y a antígenos ambientales no patógeno. En la luz intestinal, los microorganismos desempeñan un papel vital en el desarrollo de un sistema inmunitario robusto y equilibrado (Holzapfel et al, 1998).

Los perfiles de una microbiota intestinal que están asociados con la salud son difíciles de definir. La composición de la microbiota intestinal es muy variable incluso entre sujetos sanos. Los investigadores han descubierto que, incluso aunque la composición varíe entre personas, distintas composiciones pueden tener funciones similares (por ejemplo, cómo descomponen los microorganismos ciertos compuestos de los alimentos o cómo afectan al sistema inmunitario del cuerpo) (Cuarner, 2011). En consecuencia, se ha señalado que es más importante para la salud la función de la microbiota intestinal, en vez de la composición.

La mayoría de la información sobre la diversidad del ecosistema intestinal sólo ha podido obtenerse durante la última década con la introducción de los métodos ‘independientes de cultivo’, que fijan como objetivo las secuencias de nucleótidos del gen que codifica la subunidad ribosómica ARNr 16S de las bacterias (Hold et al, 2002). El empleo de estas metodologías ha revelado una gran complejidad de las poblaciones bacterianas, muy superior a la que se había estimado basándose en el cultivo bacteriológico clásico.

El uso generalizado del gen ARN ribosómico 16S como indicador para estudiar las poblaciones bacterianas se debe a propiedades intrínsecas de la molécula de ARN: (1) aparece en todos los microorganismos vivos; (2) posee un elevado grado de conservación funcional; (3) el cambio en su secuencia es un indicador de relación filogenética; (4) puede ser secuenciado directamente utilizando iniciadores dirigidos a regiones conservadas; (5) en las bases de datos públicas se dispone de más de 300.000 secuencias no redundantes.

Por otra parte, la posibilidad de que la microbiota intestinal esté implicado en el desarrollo de la autoinmunidad sistémica ha atraído recientemente una atención creciente (Hayashi et al, 2002). Sin embargo, los estudios en humanos no pueden establecer un vínculo entre la disbiosis y el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, el papel de la microbiota se ha abordado más directamente con modelos animales libres de gérmenes, observando la aparición y/o gravedad de enfermedades en ratones que han sido colonizados por una microbiota diversa.

Para determinar las implicaciones terapéuticas de estas observaciones, se necesitan más investigaciones para dilucidar cómo la microbiota es capaz de influir en las respuestas inmunes periféricas y cómo esas respuestas impulsadas por la microbiota pueden interferir con los mecanismos inmunológicos que subyacen a una enfermedad autoinmune dada.

2.3. El LES es una enfermedad autoinmune con origen multifactorial

EL LES es una enfermedad de distribución mundial, afectando a todas las razas y poblaciones estudiadas aunque no con la misma frecuencia. Los estudios actuales sobre la etiopatología de esta enfermedad se centran en cuatro elementos básicos: disfunciones del sistema inmune, factores genéticos, influencias ambientales y efectos hormonales.

2.3.1. Disfunciones del sistema inmune

El LES se cree que se desarrolla en personas susceptibles en las que existen anomalías en la regulación inmune. Estas anomalías conllevan una pérdida de tolerancia a lo propio, y son procesos que se desencadenan por una alteración en el reconocimiento de lo propio. Los mecanismos de control existentes en el organismo no actúan correctamente, de forma que un linfocito o un anticuerpo reconocen como extrañas a las células o moléculas del propio organismo. En el LES se han encontrado alteraciones en la tolerancia periférica, asociadas con un incremento en los procesos apoptóticos y/o defectos en la eliminación de los autoantígenos generados. De esta forma, nucleosomas y otras moléculas propias liberadas o modificadas durante los procesos apoptóticos estarían disponibles para ser captados por células dendríticas y presentados a linfocitos T, dando lugar a una respuesta autoinmune.

Otra de las disfunciones inmunitarias que se ha observado en el LES es una alteración en la homeostasis linfocitaria. Las células B se han encontrado activadas de forma policlonal en etapas precoces de la enfermedad y se ha descrito un defecto en la tolerancia de linfocitos B relacionado con defectos en la apoptosis y/o deficiencias del complemento, lo que conduciría a un incremento en la supervivencia de las células B autorreactivas. Por otra parte, en los últimos años se ha sugerido la implicación de los linfocitos T reguladores (TR), unas células supresoras de la respuesta inmune, en el desarrollo de las patologías autoinmunes (Liu, 2004). Se sabe que las alteraciones en TR causan la enfermedad autoinmune específica de órgano en modelos animales.

Además, las células T CD4 + CD25 + están disminuidas en pacientes con LES clínicamente activo. La disminución de la frecuencia de células T CD4 + CD25 + en pacientes adultos con LES implica que una deficiencia de células T reguladoras se asocia con la patogénesis de SLE (Crispin, 2003).

Por último, los niveles de citoquinas en la modulación de la respuesta a autoantígenos también tienen mucha importancia. Se ha sugerido que la producción alterada de ciertas citoquinas, podría causar o amplificar una respuesta inmune contra antígenos propios específicos. Una de las primeras anomalías de citoquinas descritas en pacientes con LES fue el aumento de los niveles séricos de IFN- α (interferón alfa), que se correlacionan con la actividad de la enfermedad y la gravedad, así como varios marcadores de la activación inmunitaria. Estos altos niveles de IFN- α podrían inducir la maduración y activación de células dendríticas, e incluso su diferenciación a partir de monocitos, con el consecuente aumento de la presentación de autoantígenos lúpicos, derivados en gran parte de células T autorreactivas. Además, el IFN- α puede inducir la producción de IL-10 en monocitos y células T, lo que contribuye a la expansión de células B, al cambio de isotipo y a la consecuente producción de autoanticuerpos IgG e IgA (Niewold, 2007). También podría ser debido a un aumento de la producción de IFN- α por las células productoras de IFN naturales (NIPC).

2.3.2. Factores genéticos

Teniendo en cuenta la evidencia de una gran influencia genética en el LES, hay cientos de estudios publicados que han intentado identificar genes candidatos que contribuyen al fenotipo de LES (revisado en Gaffney et al, 2001; Harley et al, 1998; Schur, 1995). La evidencia disponible apoya un papel para ciertos genes en el desarrollo del lupus:

- ◆ **Región HLA**, Muchos estudios poblacionales involucran polimorfismos genéticos de HLA de clase II (DR2 Y DR3), componentes del complemento y

receptores de baja afinidad para IgG en el predisposición a LES, aunque probablemente tengan un papel limitado en el desarrollo de la enfermedad.

- ◆ **Genes que codifican el receptor Fc de las inmunoglobulinas (FcγR).** Estos receptores están involucrados en el aclaramiento de inmunocomplejos, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la regulación de las células B. Las variantes alélicas que originan receptores de baja afinidad parecen ser más comunes en pacientes de LES (Ullvie et al, 2003).
- ◆ **Deficiencias genéticas en el complemento.** El sistema del complemento se compone de aproximadamente 20 proteínas plasmáticas que funcionan para mediar respuestas a diversos microbios infecciosos (Schur, 1995). Se han identificado deficiencias de los componentes del complemento de la vía clásica temprana (C1q, C2 y C4) relacionadas con el desarrollo de LES (revisado en Carroll, 1998; Schur, 1995). Las deficiencias en C2 o C4 son raras (una en 10.000 para C2, menos de uno de cada 10.000 para C4) y con frecuencia se asocian con una forma leve de lupus, limitada a la piel (Arnett y Diana, 1992). Deficiencias congénitas de C1q, C1r y C1s se asociaron con susceptibilidad al LES o con nefritis lúpica y producción de anticuerpos frente al DNA nativo.
- ◆ **Genes implicados en la apoptosis.** Un aumento de la supervivencia de células B autorreactivas podría explicar la incrementada producción de autoanticuerpos. Por otra parte, polimorfismos genéticos en el gen PDCD I (programmed cell death I gene) se han asociado con susceptibilidad al LES (John et al, 1998).

2.3.3. Factores ambientales

Los factores ambientales que parecen estar implicados en la etiología del lupus incluyen la exposición a la luz solar, el estrés, determinados sustancias químicas y agentes infecciosos, fundamentalmente virus.

2.3.4. Factores hormonales

El LES aparece mayoritariamente en mujeres en edad fértil, con frecuencia jóvenes, durante el embarazo o en el periodo posparto. En pacientes ya diagnosticadas, la actividad de la enfermedad suele incrementarse durante el embarazo. También se encontró una relación con el uso de anticonceptivos orales y en particular con los que contienen estrógenos. Por todos ello, desde hace mucho tiempo se considera que las hormonas afectan de forma importante al desarrollo de la enfermedad. Los estudios con animales de experimentación también confirman esta hipótesis. Sin embargo, los mecanismos por los que las hormonas femeninas provocan o exacerban el LES son desconocidos.

2.4. Biomarcadores

El concepto biomarcador apareció por primera vez en el Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos. Un biomarcador generalmente se refiere a una característica medida que puede ser utilizada como un indicador de un estado o una condición biológica.

Los biomarcadores son útiles para examinar los procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Ben et al, 2009). Su localización y análisis nos permite diagnosticar una enfermedad o sencillamente la susceptibilidad de padecerla, detectar la exposición a un organismo patógeno o a un tóxico o conocer también la respuesta a un determinado tratamiento farmacológico. Los biomarcadores son una herramienta muy útil para el diagnóstico preciso y específico de estados de enfermedad, y también para su pronóstico y posible terapia.

Los primeros biomarcadores utilizados en la práctica clínica para el diagnóstico de enfermedades son indicadores fisiológicos, tales como la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca o la presión sanguínea. Estos biomarcadores son fácilmente accesibles por lo que podrían ser medidos de manera sencilla y, por otra parte, se encuentran directamente relacionados con la fisiopatología de la enfermedad.

Los avances que se produjeron en el siglo XX, incluidos los grandes avances que tuvieron lugar en campos como la bioquímica, supusieron la llegada de una oleada de biomarcadores que se evaluaban a través de fluidos corporales como la sangre, el plasma, la orina y diferentes tejidos. Como ejemplos tenemos los niveles de glucosa en sangre, colesterol, y enzimas hepáticas (Gema, 2010).

La investigación en el campo de los biomarcadores está experimentando un desarrollo exponencial. El descubrimiento de un biomarcador consta de un proceso de dos etapas: **identificación** de posibles candidatos a biomarcador y **validación** clínica del biomarcador.

Durante la fase de identificación, el candidato a biomarcador puede ser obtenido a partir de la literatura científica existente o puede tratarse de biomarcadores “de novo”, obtenidos mediante diferentes tecnologías. En nuestro caso, el objetivo es conseguir relacionar una característica con un hecho biológico que tenga relevancia clínica (LES) (Ehlers, 2008). Para ello se buscan diferencias genéticas, proteicas o metabólicas entre individuos sanos y enfermos. Se identifican diferentes biomarcadores y se busca la posible causa para descartar aquellos que no tengan relación con la enfermedad.

Un biomarcador solo puede considerarse validado en clínica cuando puede ser medido fácilmente mediante un test que tenga unas características bien establecidas, y para el que existe un marco científico o un conjunto de evidencias que pongan de manifiesto la fisiología, toxicología, farmacología o significado clínico de los posibles resultados del test. Sin embargo, muchas veces no existe un baremo general que mida el nivel de validación del biomarcador en la práctica clínica, y cada biomarcador debe ser validado para cada uso específico.

Por último, para que un biomarcador pueda incorporarse a la rutina clínica ha de desarrollarse un test diagnóstico sencillo, que detecte la presencia del indicador de manera precisa y robusta. El proceso de validación puede ser largo y costoso, pudiendo llegar a ser tan complejo como el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco (Puntoni, 2001).

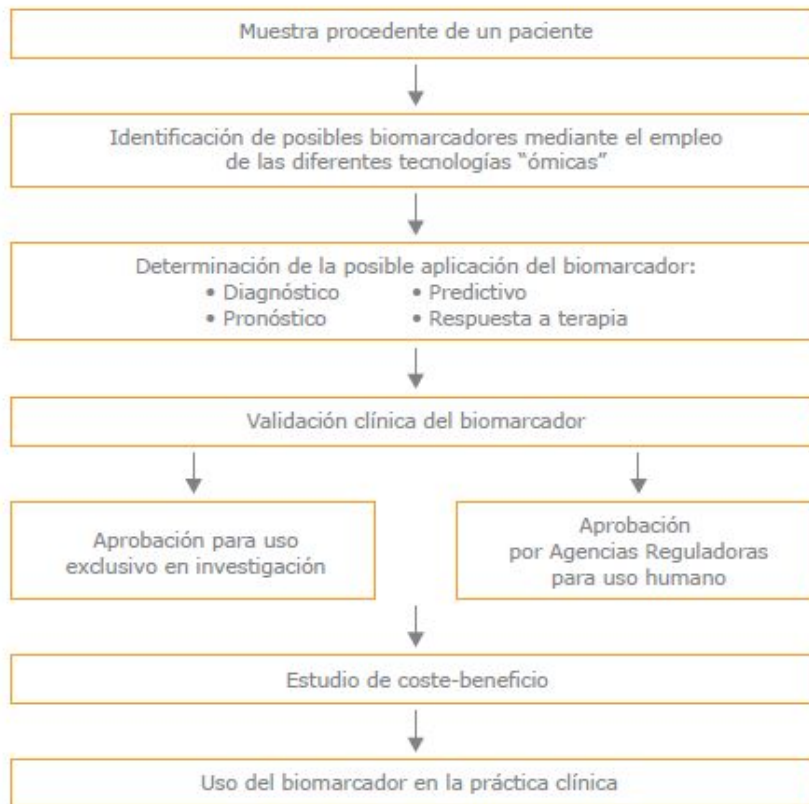


Figura 1: Cronología de la investigación con biomarcadores y de su posterior traslado a la clínica.

2.5. Anticuerpo y autoanticuerpo

Un antígeno es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria. El sistema inmunitario de nuestro cuerpo produce anticuerpos cuando detecta antígenos dañinos. Los antígenos son sustancias ajenas al cuerpo; por ello, el sistema inmunológico los reconoce como una amenaza.

Los anticuerpos son glucoproteínas plasmáticas globulares, llamadas inmunoglobulinas, y son producidas por linfocitos B maduros. La función del anticuerpo consiste en unirse al antígeno y presentarlo a células efectoras del sistema inmune.

Los anticuerpos son proteínas globulares de gran peso molecular, formadas por 4 cadenas polipeptídicas, dos pesadas, llamadas H (heavy), y dos ligeras, denominadas L (light). Estas cadenas se unen mediante puentes disulfuro, uno entre las cadenas L y

H, y dos entre las cadenas H. Estas cadenas proteicas presentan radicales glucídicos. Existen dos tipos de cadenas L, la alfa (α) y la kappa (κ), y cinco tipos de cadenas H (a, d, e, g y m), que dan lugar a los cinco tipos de inmunoglobulina existentes (A, D, E, G y M). Cada isotipo tiene una función y distribución tisular diferente, y de los cinco el IgG es el más abundante (>75%). Por otra parte, la IgA corresponde al 13% del total de inmunoglobulinas.

Un **autoanticuerpo** es un anticuerpo desarrollado por el sistema inmunitario que actúa directamente contra uno o más antígenos del propio organismo. Normalmente, nuestro sistema inmune es capaz de reconocer e ignorar aquellos antígenos de las propias células del cuerpo, además de otras sustancias inofensivas. Sin embargo, hay ocasiones en que el sistema reacciona contra antígenos propios, generando una superproducción de autoanticuerpos. Estos autoanticuerpos terminan por atacar las propias células, tejidos y órganos del cuerpo, causando inflamación y daño. Esto ocurre en las enfermedades autoinmunes: el LES y la artritis reumatoide son algunos ejemplos. Entre los autoanticuerpos identificados hasta ahora, algunos tienen importancia en el diagnóstico de las enfermedades reumáticas y pueden considerarse como marcadores serológicos.

Las causas que llevan a la producción de autoanticuerpos son variadas y todavía no son muy bien comprendidas. Al parecer la producción de algunos autoanticuerpos es debida a una cierta predisposición genética combinada con algún tipo de detonante ambiental, tal como la radiación ultravioleta, o la exposición prolongada a ciertos tipos de químicos tóxicos. En cuanto a la predisposición por sexo, las mujeres son mucho más susceptibles que los hombres a las enfermedades autoinmunes, acentuándose esta susceptibilidad hacia los últimos años de la cuarta década de vida. Se dice que puede existir un componente hormonal en el desarrollo de este tipo de enfermedades, ya que los desórdenes autoinmunes son mucho más prevalentes

entre las mujeres en edad fértil. Otra de las teorías sostiene que puede existir una cierta asociación entre genes expresados en el cromosoma X y la predisposición a padecer este tipo de enfermedades.

La mayoría de los autoanticuerpos son Ac antinucleares (ANA), aunque otros son anticitoplasmáticos o reconocen estructuras en la superficie de las células. Los ANA son autoanticuerpos que tienen como blanco el contenido del núcleo celular. La concentración de anticuerpos antinucleares está significativamente aumentada en aquellos pacientes con enfermedades autoinmunes. En general, los ANA se encuentran presentes en bajas concentraciones en la mayor parte de la población, pero existe alrededor de un 5% de la población (principalmente mujeres) en la que su concentración se encuentra significativamente aumentada, pudiendo desarrollar alguna enfermedad autoinmune. Los ANA son indicativos de lupus eritematoso sistémico (se encuentran presentes en el 80-90% de los pacientes clínicamente diagnosticados).

El método de detección habitual de los ANA en todos los laboratorios clínicos es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), dado que es un método sencillo y sensible. Con esta técnica se diferencian una serie de patrones relacionados con la presencia de determinados Ac.

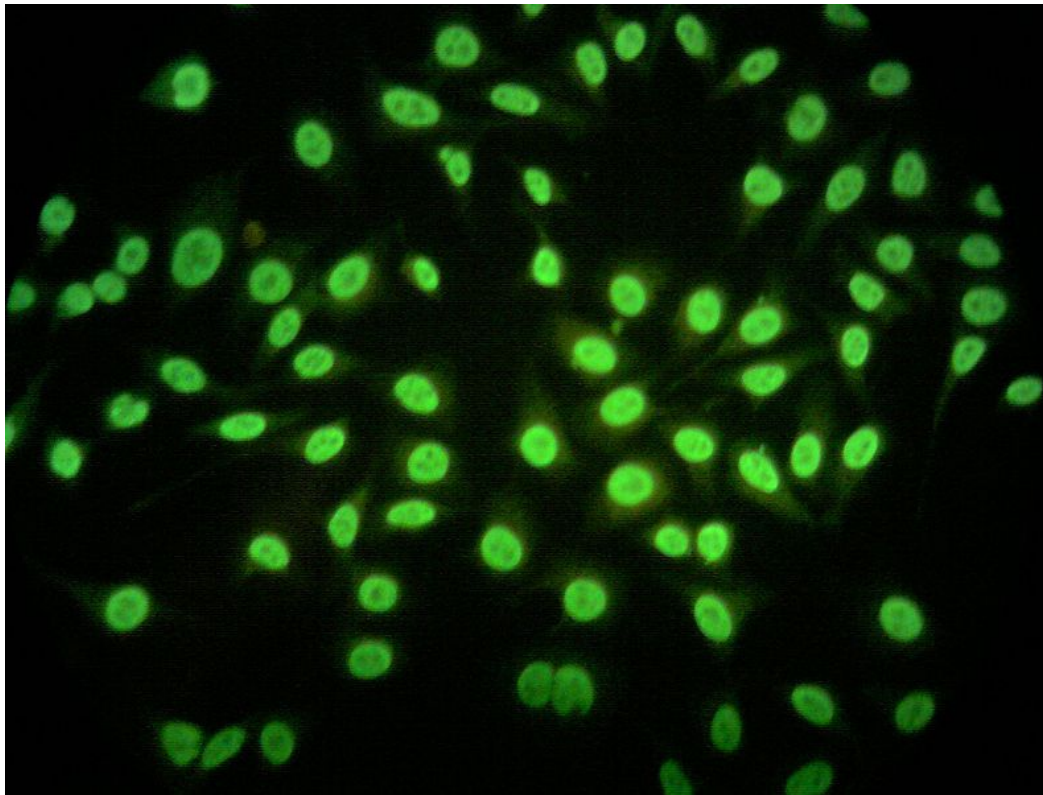


Figura 2: Microfotografía de un preparado obtenido por IFI de células tumorales de línea HEp-2 expuestas a suero de un paciente con LES (anticuerpos primarios) y luego marcado con un anticuerpo secundario de ratón Anti-humana-IgG.

2.6. Electro-transferencia de proteínas y Western Blot

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) es probablemente la técnica analítica más común utilizado para separar y caracterizar proteínas. Una solución de acrilamida y bisacrilamida se polimeriza , formando un gel que causa una baja movilidad electroforética. La polimerización de acrilamida y bisacrilamida es inducida por persulfato de amonio (APS), que espontáneamente se descompone para formar radicales libres. Además, la mezcla incluye TEMED, un estabilizador de radicales libres que induce la polimerización, y dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente anfipático que hace que las proteínas se desnaturalicen. El SDS también confiere carga negativa. En presencia de SDS, la carga intrínseca de una proteína está enmascarada. Durante SDS-PAGE, todas las proteínas migran hacia el ánodo

negativamente pueden migrar desde el gel a la membrana, teniendo en cuenta dos importantes consideraciones: (1) el contacto cercano de gel y membrana para asegurar una imagen clara y (2) la membrana ha de estar entre el gel y el electrodo positivo.

Esta tipo de transferencia se denomina transferencia electroforética y se prefiere para proteínas de peso molecular alto.

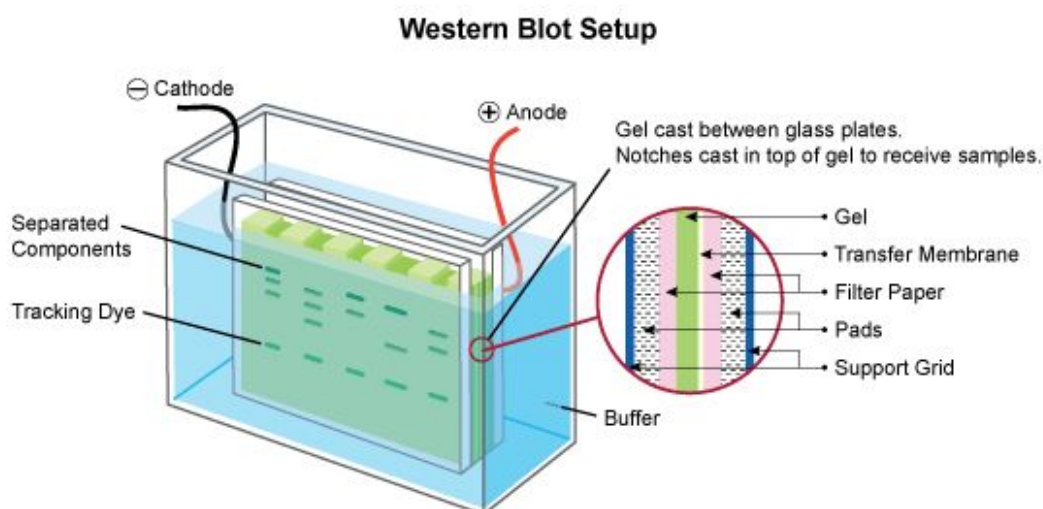


Diagram 1: Illustration of Western Blot Setup.

Figura 4: Montaje del sándwich en la cubeta de electroforesis.

Todo el sistema se comprime adecuadamente, evitando la formación de burbujas de aire, y se sumerge en una cubeta de electroforesis con buffer de ácido N-ciclohexil-3-aminopropanesulfónico (CAPS). Para que se produzca la electrotransferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF, se conectan los electrodos a la fuente de electricidad y se aplica un voltaje.

Después de la electrotransferencia, se separa la membrana, y se realizan una serie de incubaciones de la misma. Primero se le añade una solución de bloqueo, que evita que los anticuerpos se unan a la membrana de forma inespecífica. Esta solución suele estar compuesta por leche desnatada al 5% (p/v) en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con Tween 80 al 0,1% (v/v) (PBST).

Para detectar las proteínas se utilizan anticuerpos conjugados, por lo general, con un enzima, por ejemplo peroxidasa de rábano silvestre (HRP), una pequeña enzima que es detectada por la señal que produce. La HRP constituye un método de detección barato y sencillo. La etiqueta HRP se detecta cuando se expone a una solución de sustrato en la etapa final del procedimiento de inmunodetección. Las soluciones de sustrato son reactivos químicos que son convertidos por la enzima en un producto que genera una señal que se puede medir fácilmente. Para la HRP, los sustratos más utilizados son el TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina), el 4-CN (4-cloro-1-naftol) y el DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina). En nuestro caso, la mezcla de 4-CN y DAB ofrece resultados y sensibilidad comparables a la bioluminiscencia (se detecta 1 ng de proteína con una incubación de 15-30 min).

Por tanto, y si la detección es exitosa, aparecerán bandas inmunoreactivas en la membrana en los sitios donde se haya transferido la proteína y donde se hayan unido anticuerpos presentes en el suero.

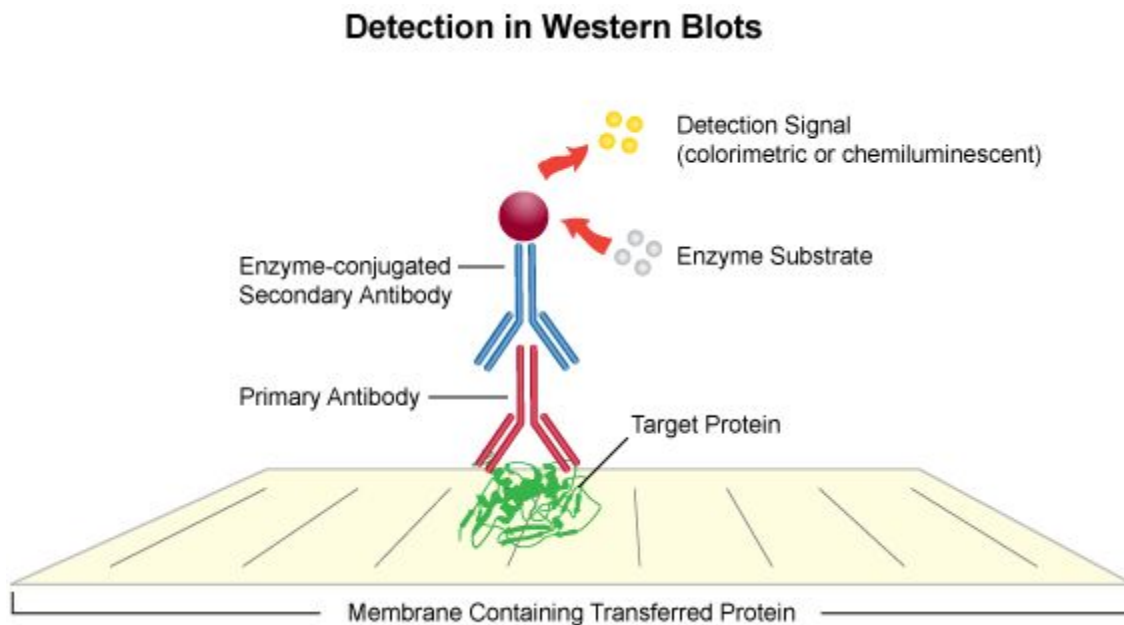


Figura 5: Esquema de la interacción entre el antígeno, el anticuerpo primario y el secundario unido a HRP.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Preparación de las muestras y extracción de las proteínas.

Las muestras del estudio, tanto heces como suero sanguíneo, abarcaron 18 pacientes de LES (códigos LS) y 17 controles sanos (códigos HD) (Tabla 2).

Los pacientes cumplen al menos cuatro criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología para el diagnóstico de esta enfermedad (Tan et al, 1982). Todos los pacientes eran mujeres de origen caucásico, de edad media 49,2 años, y no tenían la enfermedad activa en el momento de muestreo (índice de actividad de la enfermedad SLEDAI \leq 8).

Dieciocho mujeres sanas de edad similar (46,9 años) fueron reclutadas como controles sanos.

Códigos grupo LS	Códigos grupo HD
LS1	HD4
LS2	HD6
LS4	HD8
LS5	HD11
LS6	HD13
LS7	HD14
LS11	HD16
LS12	HD19
LS13	HD20
LS14	HD21
LS15	HD22
LS16	HD26
LS17	HD28
LS18	HD29
LS20	HD30

LS21	HD32
LS22	HD33
LS26	

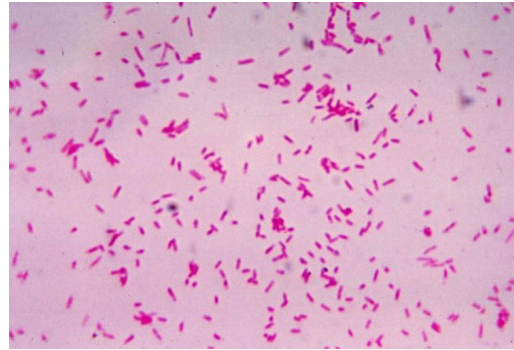
Tabla 2: Códigos de las muestras analizadas en este trabajo.

La información sobre las manifestaciones clínicas se obtuvo mediante la revisión de historias clínicas. A los pacientes también se les hicieron preguntas precisas sobre el tratamiento farmacológico recibido durante los 6 meses previos. Sólo aquellos individuos que no habían usado antibióticos, glucocorticoides, fármacos inmunosupresores, anticuerpos monoclonales y otras inmunoterapias fueron reclutados para el estudio.

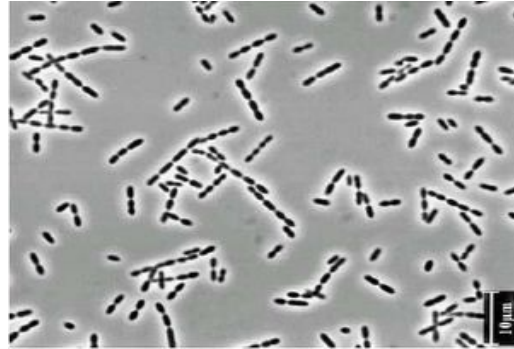
3.2 Condiciones de cultivo y cepas utilizadas

Para el aislamiento de proteínas intracelulares bacterianas se escogieron tres microorganismos presentes en la población bacteriana intestinal normal en humanos: *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079, *Blautia coccoides* DSM935, y *Ruminococcus obeum*. DSM25238.

Crecimos todas las cepas en 250 mL de medio RCM (Reinforced Clostridial Media)/BHI (Brain heart infusion broth AS-872), durante 24 horas a 37°C en anaerobiosis. Se recogió la masa celular por centrifugación y se sembraron 100µL de los cultivos en placas del mismo medio en las mismas condiciones para observar colonias aisladas.



Para asegurar que las bacterias se cultivaron bien, llevamos a cabo primero la visualización de las colonias al



microscopio óptico para ver su morfología, y posteriormente comprobamos la especie mediante genotipado de la subunidad 16S ribosomal bacteriana, molécula que se utiliza para el estudio taxonómico de especies y permite discriminar fácilmente a bacterias individuales en mezclas de todo tipo.

- **Microscopio:**

Bacteroides tethaiotaomicron: son bacilos cortos, la mayoría son individuales y opacos, no móviles, con extremos redondeados. Cadenas de células muy larga en cultivo de 48 h.

Ruminococcus obeum:

Son cocos con estructura ovalada y la mayoría existen como agregados dos a dos; son opacos y no móviles.

Blautia coccooides:

La mayoría son más cortos que *Bacteroides*, algunos forman agregados o forman cadenas largas, son opacos.

Para enviar las bacterias a secuenciar, es necesario extraer su ADN y amplificar el gen del 16S RNA. Esto lo haremos con el kit comercial de purificación de DNA de cultivos bacterianos Sigma Genelute™ Bacterial Genomic DNA Kit. Se sigue el protocolo de extracción de ADN para microorganismos Gram-positivos, y se hace la digestión de pared celular a con 9 mg lisozima y 0,5g mutanolisina.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis con gel de agarosa

La reacción de amplificación del 16S RNA mediante PCR tiene lugar en un volumen total de 25 µl; se mezclan 1 µl de ADN; con 1µl primer PLB; 1µl primer MLB, 12,5 µl Dream TaqPolimerasa y 9,5 µl H2O Sigma.

Las condiciones de PCR son:

- 5 minutos de 95 °C para activar ADN TaqPolimerasa,
- 30 ciclos de desnaturalización del DNA que consisten en:
 - 30 s en 94°C, anillamiento
 - 1 minuto en 50°C
 - 40s de extensión en 68°C.

- Final 10 minutos a 68°C para terminar la extensión.

Para visualizar que los productos de PCR se sintetizaron correctamente los corremos en un gel de agarosa al 1% durante 30 min a 150 voltios. Usamos el marcador Mass Ruler™ DNA ladder para comparar el tamaño de fragmento con unos estándares de peso molecular de DNA.

La secuenciación de los amplicones ha sido realizada por la empresa Macrogen. Tras la comparación de la secuencia de nucleótidos con las bases de datos de genes 16S rDNA aseguraremos que son los microorganismos estudiados.

3.3. Extracción de proteína de microbiota fecal y cuantificación

Partimos de materia fecal fresca (entre 10 y 50 gramos por persona), recogida en recipientes estériles e inmediatamente manipulada y homogeneizada en un plazo máximo de 3 horas después de la defecación. Durante el período de espera las muestras se mantuvieron a 4°C.

La descongelación de las muestras se produjo de manera gradual durante 2 horas a 4°C para minimizar la posible pérdida de los grupos bacterianos más sensibles a los cambios de temperatura. El procesamiento de las heces para la obtención de la microbiota se realizó de la siguiente forma:

Entre 1-2 g de las muestras de heces se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (1 ml por 0,5 g) y se mezclaron durante al menos 1 min. Las muestras se centrifugaron después a 1.000g a 4 °C durante 2 minutos para eliminar los residuos fecales; los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo a 4°C y 13.000g durante 5 min para sedimentar las células bacterianas. El sedimento celular se resuspendió otra vez en 1 ml de tampón PBS, y se centrifugó a 4 °C y 13.000g durante 5 min para sedimentar las células bacterianas.

Una de las muestras se mantuvo a -80°C y la otra se utilizó para la extracción de proteínas.

Para la obtención de un extracto de proteína total de microbiota intestinal, las células aisladas de heces en los pasos anteriores, se volvieron a resuspender en 1,2 ml del reactivo comercial de lisis bacteriana BugBuster (Novagen) con 4 μl de solución Lysonasa, durante 30 min en hielo.

Después de la incubación, las células se rompieron aún más por sonicación usando un sonicador Sonios Vibra Cell (Materials INC) durante 3 ciclos de 1 min a 10 vatios. Los extractos se centrifugaron durante 10 min a $12.000g$ y 4°C para separar los residuos celulares y las células intactas del extracto proteico, y se aspiró el sobrenadante con cuidado (para evitar perturbar el sedimento) y se transfirió a un nuevo tubo.

La cuantificación de la proteína en el extracto se realizó mediante dos métodos. El primero fue el método comercial del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, BCATM Protein Assay Kit). Este método combina la conocida reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por la proteína en un medio alcalino (la reacción de Biuret) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva de catión cuproso (Cu^{+1}) usando un reactivo único que contiene ácido bicinonínico. El producto de reacción de color púrpura de este ensayo está formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso.

El procedimiento seguido fue el de mezclar 50 μl de un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones dadas, y muestras de concentración desconocida de los extractos, con los dos reactivos del kit comercial: 1ml BCA reactivo A con 20 μl BCA reactivo B para cada estándar y muestra.

Se incubaron los tubos a 37°C durante 30 minutos hasta que el color cambia a violeta. (rango de trabajo= 20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA).

Se prepara una curva estándar representando gráficamente la medida media de absorbancia a la longitud de onda de 562nm para cada patrón de BSA frente a su concentración en $\mu\text{g}/\text{ml}$. Utilizamos la curva estándar para determinar la concentración de proteína de cada muestra desconocida.

El segundo método fue el método de Lowry. Este método tiene la ventaja de ser extremadamente sensible, capaz de detectar cantidades del orden de 10 µg de proteína. Su inconveniente principal es que al evaluar, como veremos, los fenoles presentes en la proteína (esencialmente residuos de tiroxina), la intensidad del color resultante varía entre las distintas proteínas. La reacción que tiene lugar en el método de Lowry se desarrolla en las siguientes fases:

- Reacción de Biuret: característica de grupos aminopeptídicos, con los que el Cu(II) en medio alcalino forma enlaces de coordinación, originando complejos de color violeta.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu: característica de grupos -OH reductores que, junto con los complejos cuproproteicos de la reacción del Biuret, reducen el reactivo de Folin, el cual vira a color azul oscuro.

Los reactivos se utilizaron en el método de Lowry son los siguientes:

Solución A: 2% de Na₂CO₃ +0.5%SDS en agua;

Solución B1: 1% de CuSO₄.5H₂O (en agua);

Solución B2: 2%de Na-K-tartrato(en agua);

Solución C: 1ml de B1 +1ml de B2 a 100ml de A (preparar fresca);

Solución D: diluir reactivo de FOLIN en agua en proporción 1:1 (preparar fresca);

Solución BSA 2mg/ml. Preparar standars de calibración de BSA de concentración: 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/ml.

Se mide la absorbancia resultado de las muestras a 540nm, y se prepara una curva estándar representando gráficamente la medida media de absorbancia para cada patrón de BSA frente a su concentración en µg/ml. Del mismo modo que con el método de BCA se cuantifica la cantidad de proteína de los extractos de microbiota.

3.4. SDS-PAGE y Western Blot

3.4.1. Elaboración de los geles de SDS- PAGE

Las proteínas bacterianas contenidas en el extracto se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5 %) en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1971). Un resumen de la composición de los geles que se utilizaron durante todo el trabajo se muestra en esta tabla:

	<u>Gel de separación 12,5%</u>	<u>Gel de empaquetamiento 5%</u>
Solución de acrilamida-bis% 37: 5: 1	6.26 mL	1.25 ml
1,5 M Tris/ HCL pH 8,8	5 ml	
0,5 M Tris/ HCL pH 6,8		2.5 ml
Agua miliQ	8.54 ml	6.15 ml
SDS (10% w/v solución)	0.2 ml	0.1 ml
TEMED	0.03 ml	0.015 ml
APS	0.06 ml	0.03 ml

Tabla 3: Composición de cuatro geles de poliacrilamida.

La electroforesis se lleva a cabo en una cubeta vertical Mini-Protean®3 (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los geles se elaboraron a partir de una disolución de acrilamida 30% (p/v) monómero total; 2,67% (p/v) entrecruzamiento. El gel superior de compactación o empaquetamiento de proteínas es de unos 2 cm de altura preparado al 4% (p/v) de monómero total, con Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; y el gel inferior de resolución con un porcentaje de acrilamida del 12 % (p/v), Tris-HCl 0,375 M pH 8,8.

La concentración de SDS en ambos geles es de 0,1% (p/v). Y el tampón de electroforesis (pH 8,3) contiene Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % (p/v). Para cargar en cada pocillo de gel el volumen adecuado, cuantificamos la concentración de proteína y cargamos 40 µg de proteína por pocillo (Sánchez et al, 2009).

3.4.2. Procedimiento de separación de proteínas:

Las muestras de volumen adecuado se mezclaron con tampón de muestra (5X Sample loading buffer). Se calientan a 95°C durante 5 minutos y se centrifuga 2 minutos a 1.300g.

Composición del loading Buffer: 0,313 M de Tris-HCl (pH 6,8 a 25°C); 10% de SDS; 0,05% de azul de bromofenol; 50% de glicerol.

También se añade en uno de los pocillos una mezcla de proteínas que sirve como marcador de masa molecular: Page Ruler Prestained (Thermo-Scientific). La electroforesis transcurre durante 1 hora a 40 mA.

Para la visualización de las proteínas, los geles se lavaron 3 veces 5 minutos con agua destilada y se tiñeron con un Coomassie coloidal (0,12% Coomassie Blue G-250; 10% sulfato de amonio; 10% ácido ortofosfórico; 20% metanol, agua milliQ hasta 1 litro) un mínimo de 2h. Luego se dejaron desteñir durante una noche.

3.4.3. Análisis de las proteínas mediante Western Blot

Este análisis se realizó sobre una colección de sueros de individuos con lupus y otro grupo de individuos control sanos, proporcionados por la Dra. Ana Suárez, del Área de Inmunología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.

Para la detección de bandas inmunoreactivas en los extractos de proteínas, se hicieron migrar 40 µg de las muestras preparadas en un sistema SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Para que se produzca la electrotransferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF, se conectan los electrodos a la fuente de electricidad y se aplica un voltaje constante de 50V durante 30min (en un sistema de Amersham Biosciences). Esta transferencia se realiza de igual manera para todos los ensayos de Western blot de aquí en adelante.

En los siguientes apartados de Western Blot, hicimos diferentes pruebas para buscar unas mejores condiciones de ensayo. Se probaron diferentes fuentes de procedencia de proteína bacteriana, diferentes anticuerpos primarios, tiempos de incubación con anticuerpos, lavados entre pasos, condiciones de revelado de señal, etc.

- **Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota. Detección de IgG.**

Las membranas se bloquearon en PBS con 0.1% (v/v) de Tween-20 (PBST), suplementado a su vez con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) (PBST-L), durante 15 minutos a temperatura ambiente.

En este paso, en los geles se cargaran proteínas de cultivos puros de 3 microorganismos y proteínas de microbiota de heces de HD6, HD8, HD22, LS5, LS15.

Posteriormente se incubaron con una mezcla de sueros de los dos grupos diluidos 1:80 en PBST-L, durante una hora a temperatura ambiente con una agitación ligera. Las membranas se lavaron 3 veces con PBST-L, y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-human-IgG-HRP (Sigma-Aldrich), diluido 1:1500 en PBST-L. Se hacen 2 lavados posteriores con PBSTL y otros 2 con PBST antes de proceder al revelado.

La reacción antígeno-anticuerpo se detectó mediante la reacción de transformación del sustrato CN/DAB, del enzima peroxidasa de rábano (HRP) que está unida al anticuerpo secundario IgG (Bio-Rad).

- **Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota. Detección de IgA.**

En los geles se cargaron 40µg de proteína de las muestras de cultivos puros de 3 microorganismos y proteínas de microbiota de heces de HD14, HD30, LS13, LS14, LS11.

Los sueros pool de los grupos HD y LS se diluyeron con PBST-L (1:100) como Ac primario; el anticuerpo secundario anti-human IgA-HRP (Sigma-Aldrich) se usó en

dilución 1:1500, y en el último paso, el revelador fue la mezcla de 8ml reactivo de HRP 1X y 2ml sustrato.

- **Western blot reactividad de proteínas bacterianas y de microbiota con sueros individuales**

En las siguientes pruebas, usamos los sueros individuales de las muestras como anticuerpo primario. Al principio intentamos estudiar la inmunoreactividad de las proteínas bacterianas con los sueros de individuos con lupus y controles sanos. Para ello cargamos cuatro calles de un gel de SDS-PAGE con 20µg HD pool, 40µg de HD pool, 20µg de LS pool, 40µg de LS pool, y el resto de calles del gel con muestras de las proteínas de cultivos puros de 3 microorganismos.

Los anticuerpos primarios fueron los sueros de LS2, LS21, HD4, HD26. Todas las proporciones y volúmenes usadas de dilución fueron iguales a los del apartado anterior (1:100 anticuerpo primario, el anticuerpo secundario anti-humano-IgG-HRP 1:1500 con PBST-L, y en el último paso, el revelador fue la mezcla de 8ml reactivo de HRP 1X y 2ml sustrato).

- **Western blot reactividad de proteínas de microbiota con sueros individuales**

En este paso, cargamos varios geles con 40µg de muestras en el siguiente orden: Marcador, HD pool de proteínas, LS pool de proteínas.

En cada gel caben 3 grupos como este, y lo que hacemos es cortar la membrana después de la transferencia, se bloquearon separadamente, y se incubaron con sueros individuales de los individuos de los dos grupos. Todas las condiciones, volúmenes y diluciones de anticuerpos fueron iguales a las del apartado anterior (1:100 anticuerpo primario, el anticuerpo secundario anti-humano-IgG-HRP 1:1500 con PBST-L, y en el último paso, el revelador fue la mezcla de 8ml reactivo de HRP 1X y 2ml sustrato).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cuantificación de los extractos de las proteínas.

Para el uso posterior de las proteínas es necesario cuantificar la cantidad de proteína total de los extractos. El resultado de la cuantificación por dos métodos nos permite calcular el volumen necesario de cada muestra para hacer la electroforesis.

4.1.1. Cuantificación de las proteínas de microbiota.

Para cuantificar la concentración de las muestras fecales, usamos el método comercial del ácido bicinconónico (BCA).

Concentración BSA ($\mu\text{g/ml}$)	ABS _{600nm}
0	0
25	0.035
75	0.072
125	0.111
250	0.222
500	0.457
750	0.603
1000	0.816
1500	1.15
2000	1.484

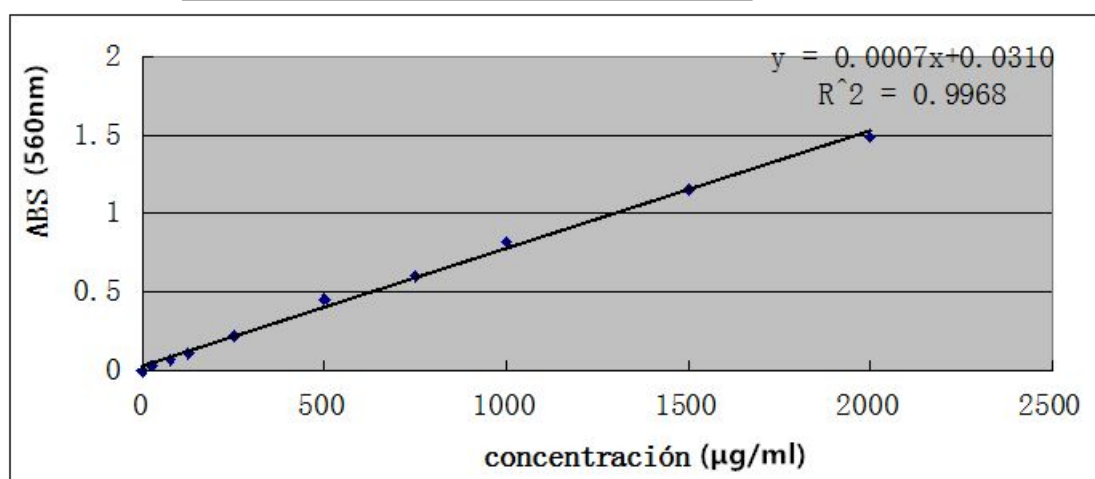


Figura 6: Patrón 1 de la concentración de proteína (método de BCA, grupo LS).

Muestra	ABS (560nm)	concentración (µg/ml)	volumen para 40µg (µl)
LS1	0.622	8,443	4.7
LS2	0.21	2,557	15.6
LS6	0.451	6,000	6.7
LS7	0.285	3,628	11
LS11	0.404	5,328	7.5
LS12	1.067	14,800	2.7
LS14	0.659	8,929	4.5
LS16	0.216	2,643	15.1
LS17	0.656	8,928	4.5
LS18	0.443	5,885	6.8
LS20	0.658	8,957	4.5
LS21	0.629	8,543	4.7
LS22	0.21	2,557	15.6
LS26	0.971	13,428	3

Tabla 4: Concentración de proteína por el método de BCA (grupo LS).

Concentración (µg/ml)	ABS (560nm)
0	0
25	0.005
125	0.118
250	0.195
500	0.391
750	0.636
2000	1.881

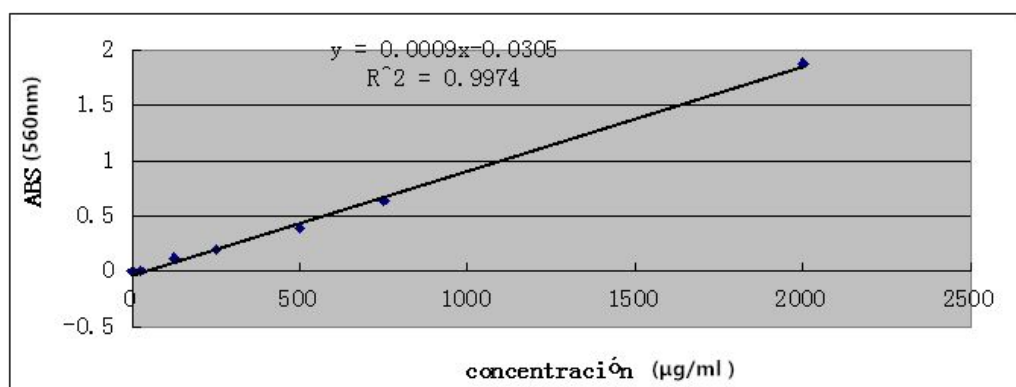


Figura 7: Patrón 2 de la concentración de proteína (método de BCA, grupo HD).

Muestra	Abs (560nm)	concentración (µg/ml)	volumen para 40 µg (µl)
HD4	1.236	14,072	2.8
HD6	0.731	8,461	4.7
HD8	0.681	7,906	5.1
HD11	0.407	4,861	8.2
HD13	0.436	5,183	7.7
HD14	0.821	9,461	4.2
HD16	0.499	5.88	6.8
HD19	0.641	7,461	5.4
HD20	0.519	6,106	6.6
HD21	0.203	2,594	15.4
HD22	0.484	5,717	7.0
HD26	0.839	9,661	4.1
HD28	0.695	8,061	5.0
HD29	0.795	9,172	4.4
HD30	0.801	9,239	4.3
HD32	0.941	10,794	3.7
HD33	0.316	3,850	10.4
LS5	0.666	7,739	5.2
LS15	1.312	14,917	2.7
LS13	0.544	6,383	6.3

Tabla 5: Concentración de proteína por el método de BCA (grupo HD).

4.1.2. Crecimiento e identificación de los microorganismos

Los valores de densidad óptica alcanzados a 600 nm llegaron a la concentración que se indica en la tabla:

Microorganismo	<i>Ruminococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Blautia</i>
OD 600nm a 24h	3,54	2,42	3,53

Tabla 6: Densidad óptica a la que se crecieron los microorganismos. OD 600 nm de las bacterias.

El siguiente paso fue la certificación de la pureza del crecimiento de las cepas mediante la secuenciación del gen del 16S RNA.

Posteriormente hicimos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis con gel de agarosa, y el resultado se muestra en la figura 8.

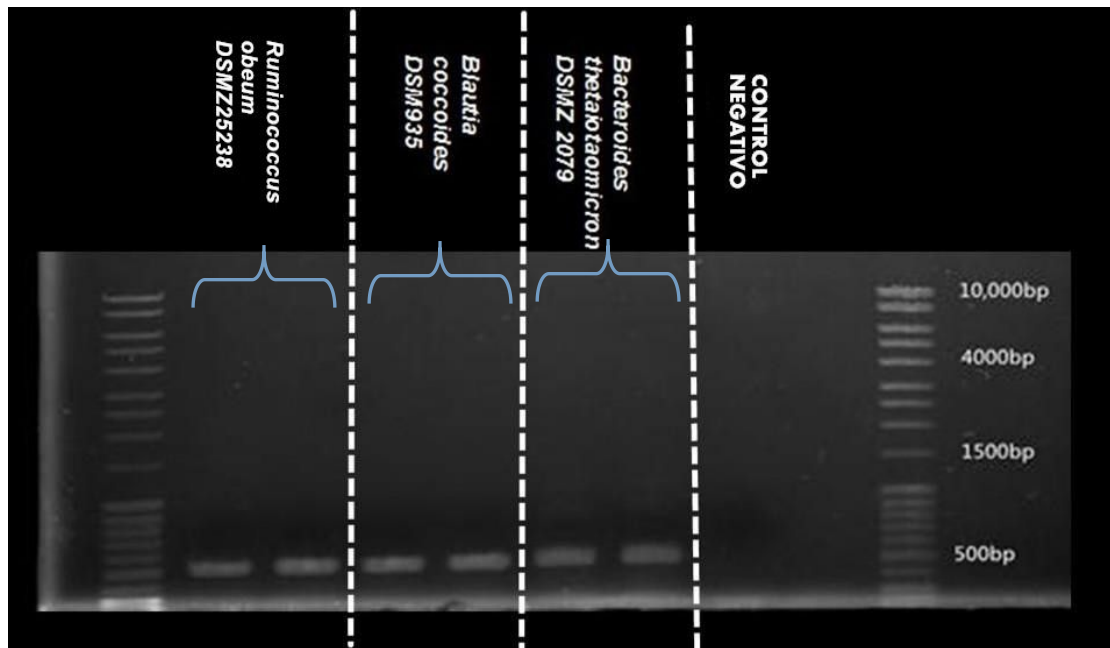


Figura 8: Electroforesis con gel de agarosa.

De acuerdo con la electroforesis, en el control negativo no hay banda, y las bandas de las bacterias son muy claras. El resultado de la secuenciación se muestra a continuación:

1. *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacteroides thetaiotaomicron strain VPI-5482 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	841	841	99%	0.0	100%	NR_074277.1
<input type="checkbox"/>	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome	841	4036	99%	0.0	100%	AE015928.1
<input type="checkbox"/>	Bacteroides thetaiotaomicron strain JCM 5827 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	99%	0.0	100%	NR_112944.1
<input type="checkbox"/>	Bacteroides sp. B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	99%	0.0	99%	EU722733.1

Figura 9: Resultado de la secuenciación parcial del gen ARN16S de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

2. *Blautia coccooides* DSM935

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Blautia coccooides strain JCM 1395 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	811	811	100%	0.0	100%	NR_104700.1
<input type="checkbox"/> Clostridium coccooides strain 8F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	811	811	100%	0.0	100%	EF025906.1
<input type="checkbox"/> Blautia producta strain JCM 1471 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	NR_113270.1
<input type="checkbox"/> Clostridium sp. 16S rRNA gene	798	798	98%	0.0	100%	Y10584.1
<input type="checkbox"/> Blautia producta strain 2396 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	NR_036776.1

Figura 10: Resultado de la secuenciación parcial del gen ARN16S de *Blautia coccooides*.

3. *Ruminococcus obeum* DSM25238

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Blautia producta strain JCM 1471 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	813	813	100%	0.0	100%	NR_113270.1
<input type="checkbox"/> Blautia coccooides strain JCM 1395 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	99%	NR_104700.1
<input type="checkbox"/> Clostridium coccooides strain 8F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	99%	EF025906.1
<input type="checkbox"/> Clostridium sp. 16S rRNA gene	787	787	98%	0.0	99%	Y10584.1
<input type="checkbox"/> Blautia producta strain 2396 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	785	785	100%	0.0	99%	NR_036776.1
<input type="checkbox"/> P.productus 16S ribosomal RNA	780	780	97%	0.0	99%	X94986.1
<input type="checkbox"/> Ruminococcus sp. M-1 gene for 16S rRNA, partial sequence	774	774	99%	0.0	98%	AB125231.1

Figura 11: Resultado de la secuenciación parcial del gen ARN16S de *Ruminococcus obeum*.

4.1.3. Cuantificación de las proteínas intracelulares bacterianas

Para cuantificar la concentración de proteínas intracelulares bacterianas, usamos dos métodos como se explicó en material y métodos. Aquí se muestra una tabla comparativa de los resultados por ambas cuantificaciones:

Muestra	Método LOWRY		Método BCA	
	Concentración (µg/µl)	Volumen para 40µg (µl)	Concentración (ug/µl)	Volumen para 40µg (µl)
<i>Ruminococcus</i>	2.48	16.14	3.04	13.15
<i>Blautia</i>	1.43	28.02	1.71	23.35
<i>Bacteroides</i>	0.78	51.44	0.73	55

Tabla 7: Concentraciones de las proteínas bacterianas por los métodos de LOWRY y BCA.

4.2. Electroforesis de proteínas

Usamos electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para separar y caracterizar las proteínas. Hicimos 12 geles de SDS-PAGE con las proteínas intracelulares bacterianas y proteínas fecales individuales. Los resultados se presentan en las figuras siguientes.

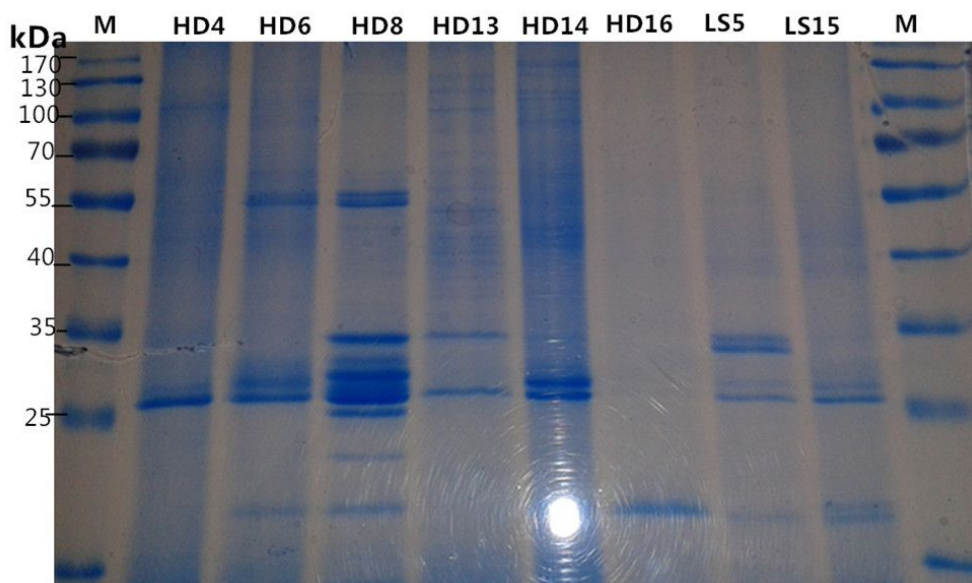


Figura 12: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las muestras individuales HD4, HD6, HD8, HD13, HD14, HD16, LS5, LS15.

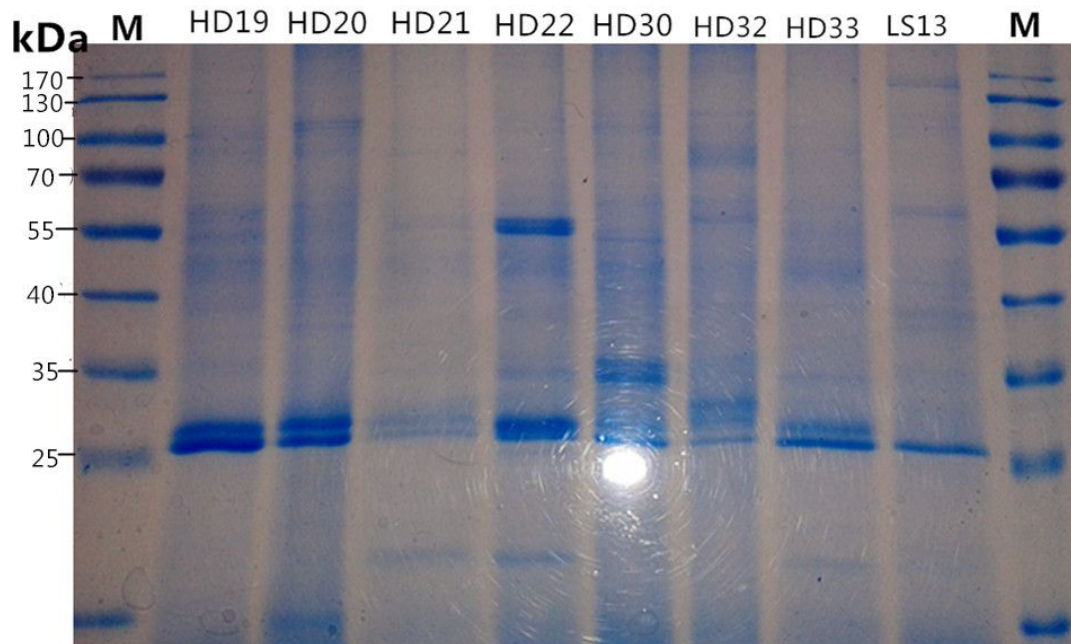


Figura 13: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las muestras individuales HD19, HD20, HD21, HD22, HD30, HD32, HD33, LS13.

Nuestro objetivo fue comparar las muestras de proteína de individuos con lupus y las de controles sanos, intentar buscar si hay homogeneidad entre las muestras de los dos grupos poblacionales, y estudiar el perfil de bandas. Podemos ver claramente que las muestras del grupo HD tienen más bandas que las del grupo LS exceptuando en este grupo de muestras a HD16 y HD21.

Todas las muestras tienen dos bandas en común de unos 25 kDa. Además, en las calles de HD6, HD8 y HD22 se presentan unas bandas que tienen aproximadamente 55kDa. Un siguiente paso a realizar en la identificación de las proteínas podrá ser la secuenciación de algunas de esas bandas mediante técnicas de espectrometría de masas, para intentar encontrar la relación entre las proteínas fecales con las proteínas conocidas bacterianas.

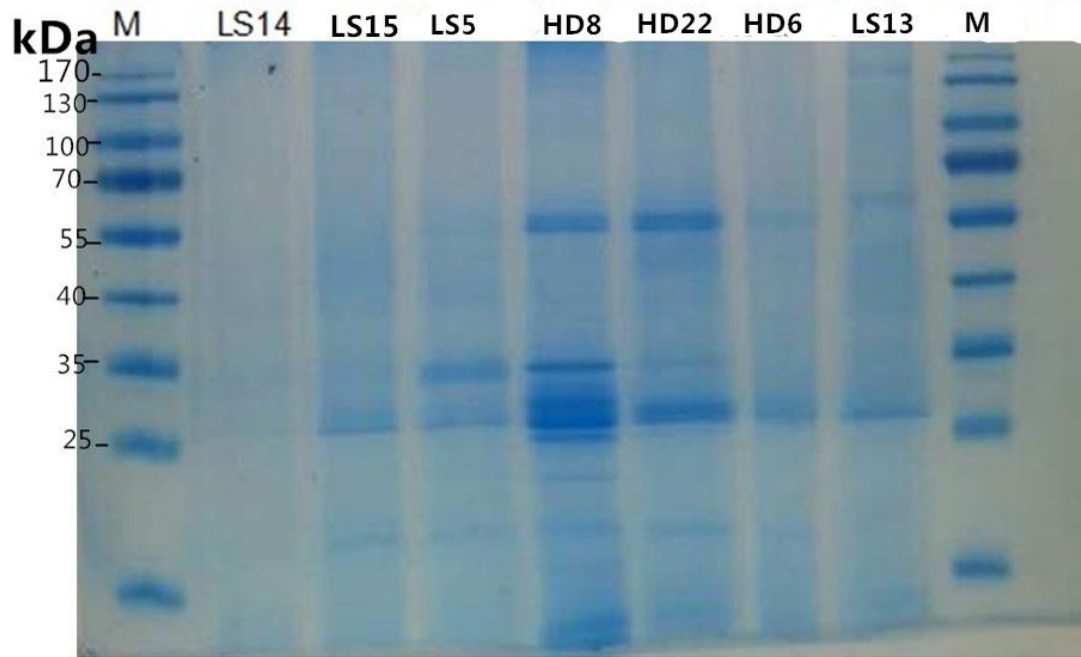


Figura 14: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las muestras de proteína individuales LS14, LS15, LS5, HD8, HD22, HD6, LS13.

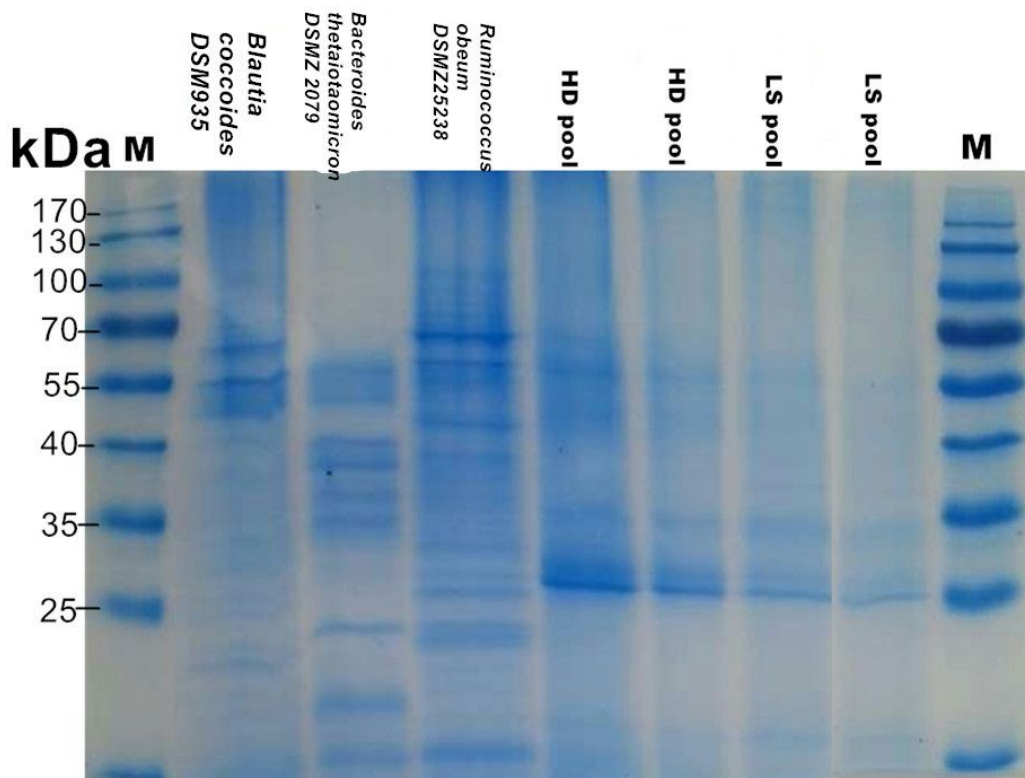


Figura 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida con las proteínas bacterianas y pool de proteínas de microbiota de HD y LS (mezcla con 10 μ g de cada muestra).

En este experimento nuestro objetivo fue la comparación del perfil de bandas de las proteínas de microbiota humana y las proteínas intracelulares bacterianas de tres microorganismos que están en diferente cantidad entre individuos sanos y lúpicos.

Se observó que las tres bacteria (*Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079, *Blautia coccoides* DSM935, y *Ruminococcus obeum*. DSM25238) tienen un gran número de bandas.

En este caso, en las dos calles de LS pool no hay diferencias importantes con los dos de HD pool. Probablemente esto se deba a que la mezcla es el conjunto de proteínas de muchas muestras y tiene mayor diversidad que los individuales.

4.3. Resultados de los análisis mediante Western Blot

4.3.1 Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota. Detección de IgG.

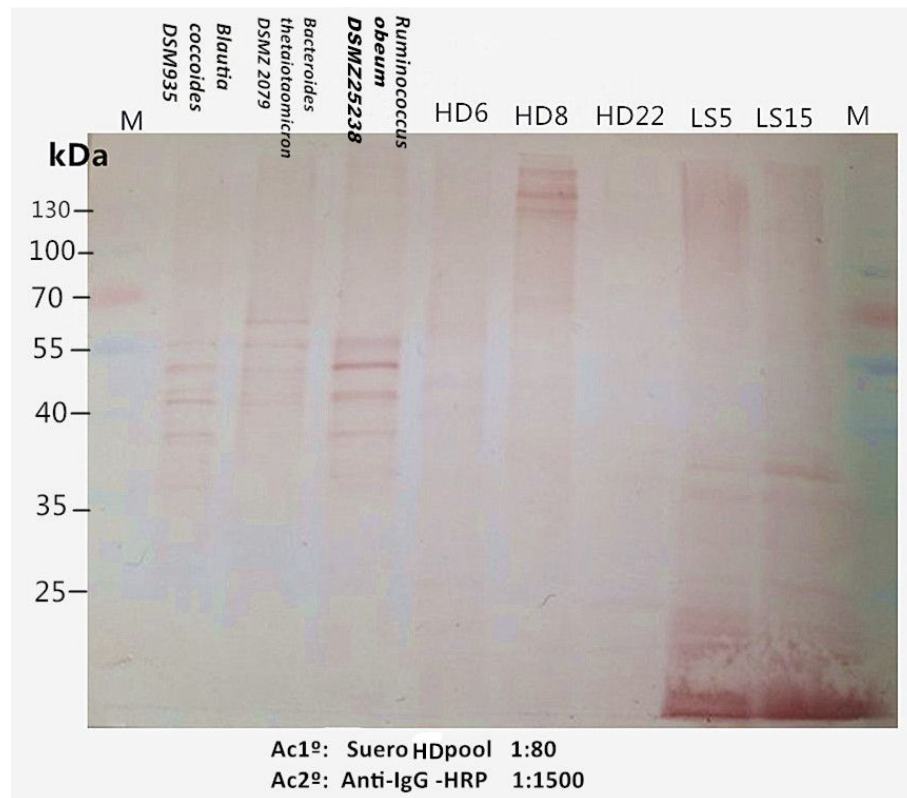


Figura 16: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota detección IgG (Anticuerpo primario: Suero HD pool).

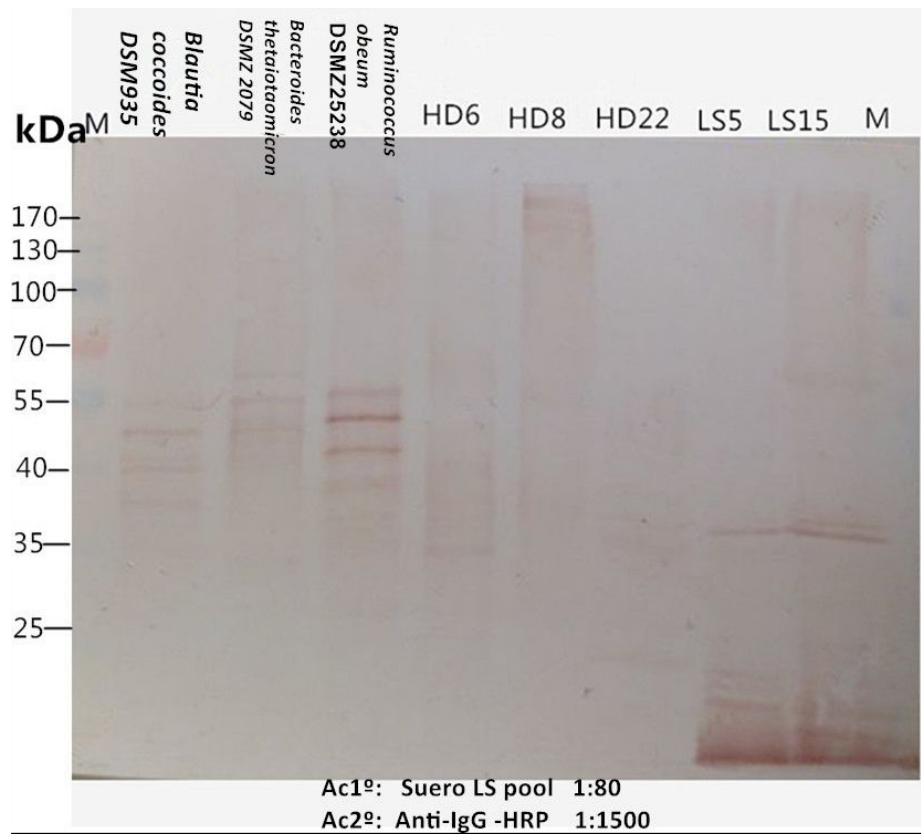


Figura 17: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota detección IgG (Anticuerpo primario: Suero LS pool).

En cada membrana, las calles se separaran como tres grupos, el grupo de bacterias, el grupo de HD y el grupo de LS. Observamos que las calles de bacterias tienen más bandas que otros dos grupos, y el peso molecular de las proteínas intracelulares bacterianas varía desde 35kDa hasta 70kDa. También observamos que hay muy pocas bandas en las calles del grupo HD. Además, el grupo LS presenta bandas de peso molecular bajo.

4.3.2. Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota. Detección de IgA.

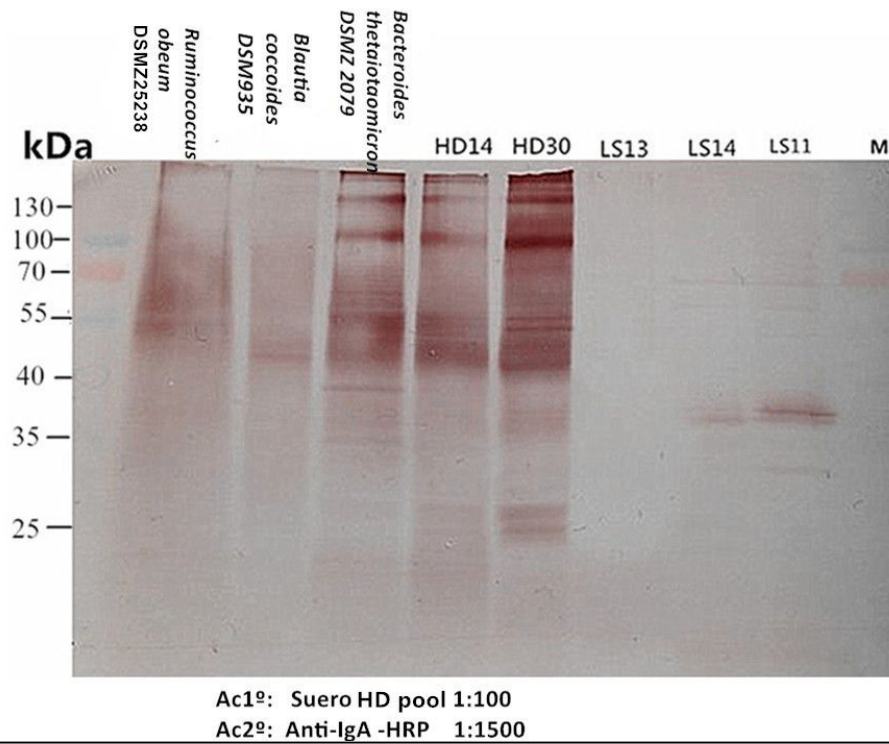


Figura 18: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota detección Ig-A (Anticuerpo primario: Suero HD pool).

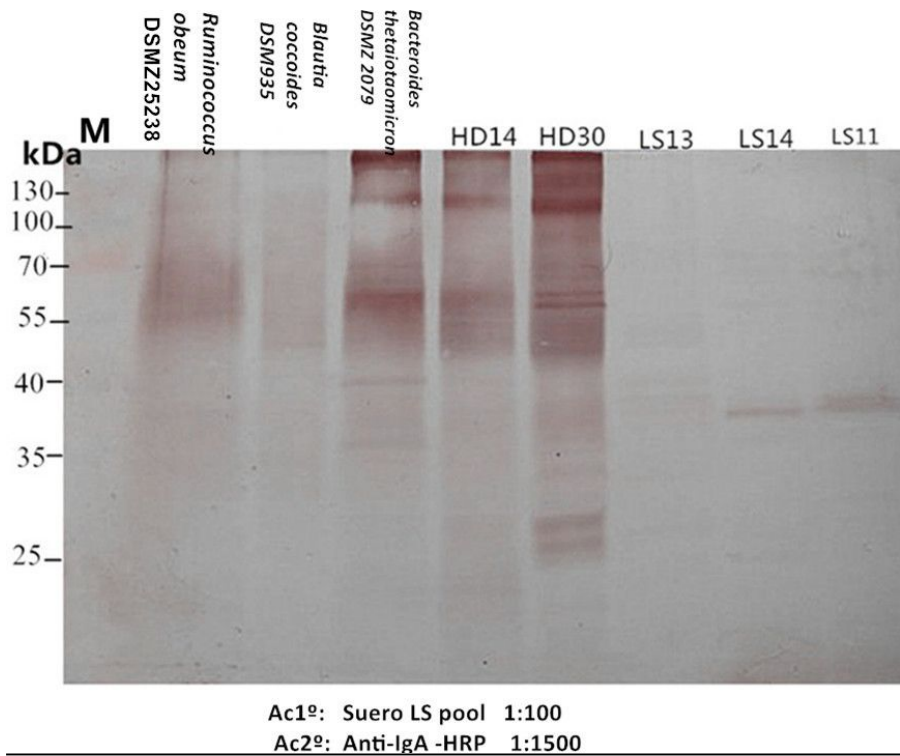


Figura 19: Western blot de proteínas bacterianas y de microbiota detección Ig-A (Anticuerpo primario: Suero LS pool).

En este caso, en las calles de *Ruminococcus* y *Blautia* se ven pocas bandas, indicando que el cambio de anticuerpo secundario tiene mucha importancia para estudiar la diversidad. Las calles de grupo HD están en consonancia el resultado de SDS-PAGE, presentan gran variedad de bandas y son moleculares grandes, muy parecidos en tamaño a las bandas de la calle de *Bacteroides*.

4.3.3. Western blot reactividad de proteínas bacterianas y de microbiota con sueros individuales

Los resultados con los anticuerpos primarios LS2, LS21, HD4, HD26 se presentan en las figuras siguientes. Se puede ver, con cada suero, que el perfil de bandas es totalmente diferente, no hay muchas bandas en común con las dos membranas de LS y de HD. En las calles de LS pool salieron más bandas que en las de HD pool. Además, encontramos que con los sueros individuales, salieron muchas menos bandas que cuando usamos pool. Con estas pruebas, confiamos que es necesario poner en práctica los experimentos con todos los sueros.

Las bandas con el suero LS2 no están bien separadas. Además, en la membrana de suero LS21 solamente hay una banda de 35kDa en las calles bacterianas. En la membrana de suero HD4 hay muy poca señal y con el suero HD26 no se observó nada en la calle de *Bacteroides*, mientras que las calles de *Ruminococcus* y *Blautia* tienen bandas claras en la misma posición. Respecto a las proteínas fecales, las calles de LS pool presentan numerosas bandas en diferentes posiciones.

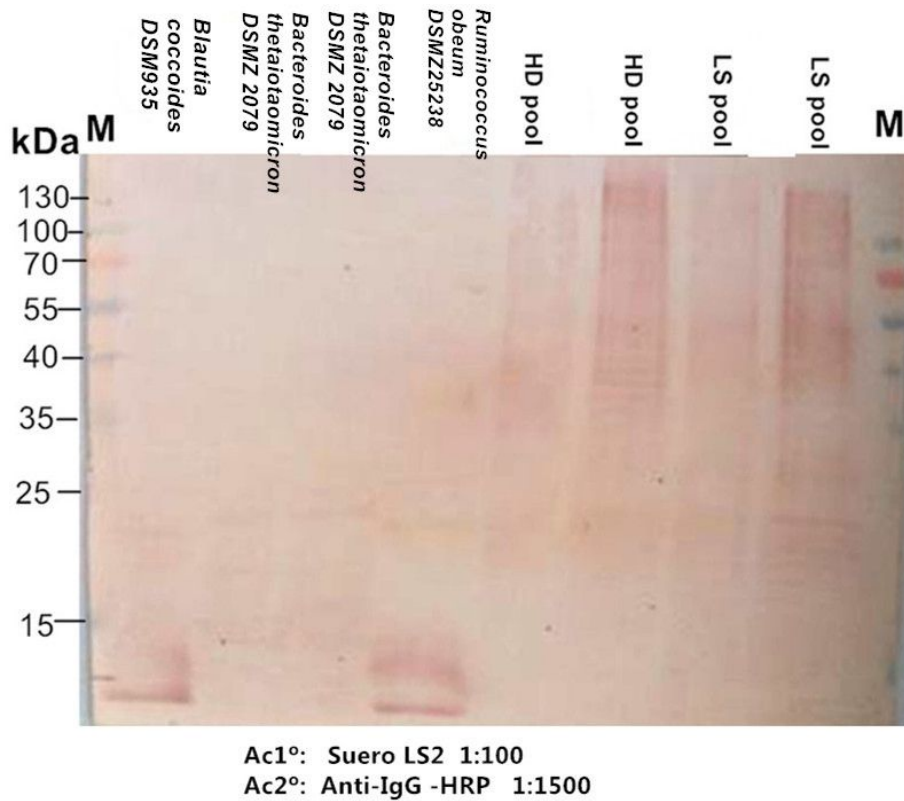


Figura 20: Western blot reactividad de proteínas bacterianas y de microbiota a Suero LS2. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

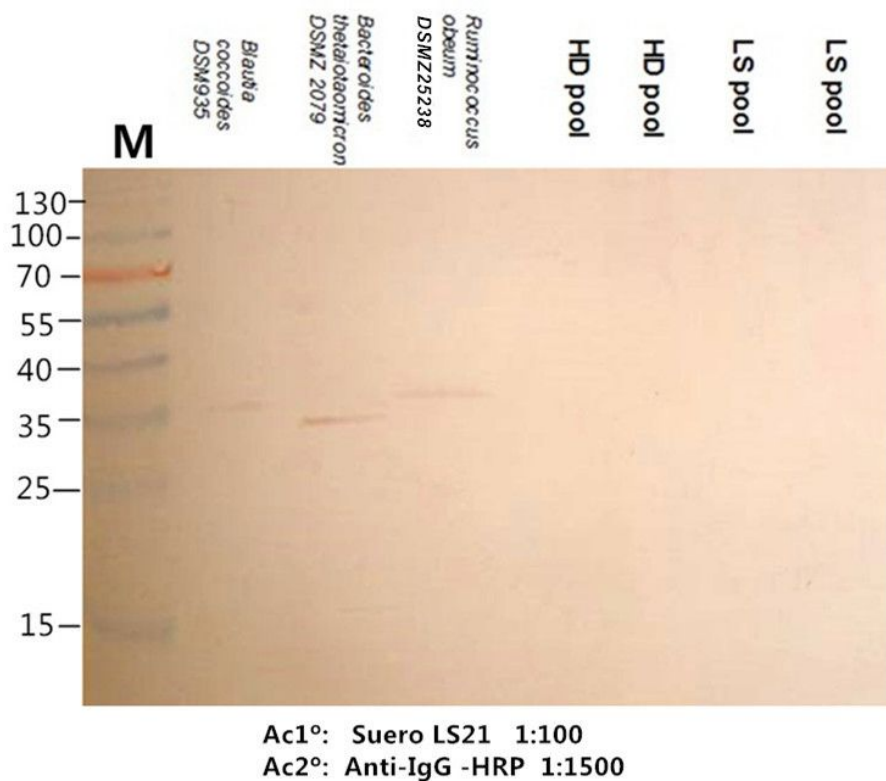


Figura 21: Western blot reactividad de proteínas bacterianas y de microbiota a Suero LS21. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

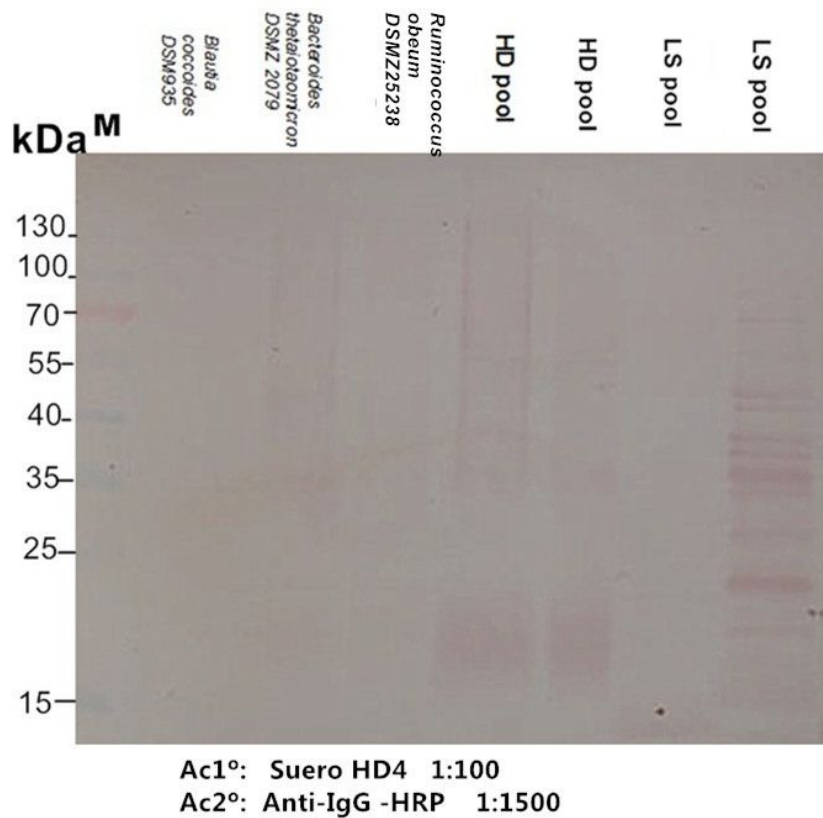


Figura 22: Western blot reactividad de proteínas bacterianas y de microbiota a Suero HD4. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

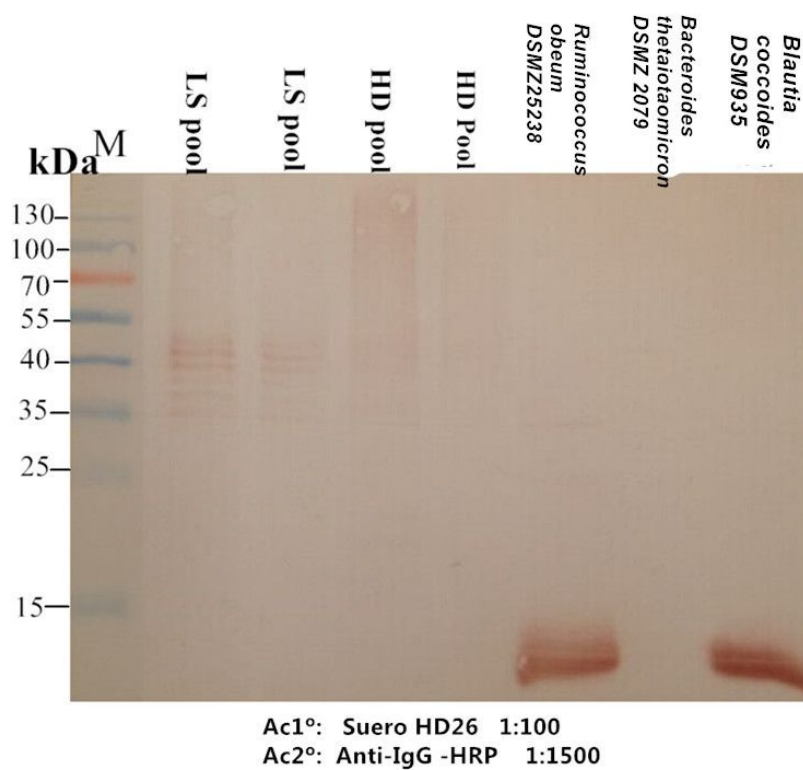


Figura 23: Western blot reactividad de proteínas bacterianas y de microbiota a Suero HD26. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500

4.3.4. Western blot reactividad de proteínas de microbiota con sueros individuales

En este apartado, cada figura contiene tres grupos de los mismos sueros. Los códigos de suero usado se marcan en las figuras, y también las diluciones.

Los perfiles de las bandas son distintos en cada suero y cada muestra, y no podimos extraer conclusiones definitivas.

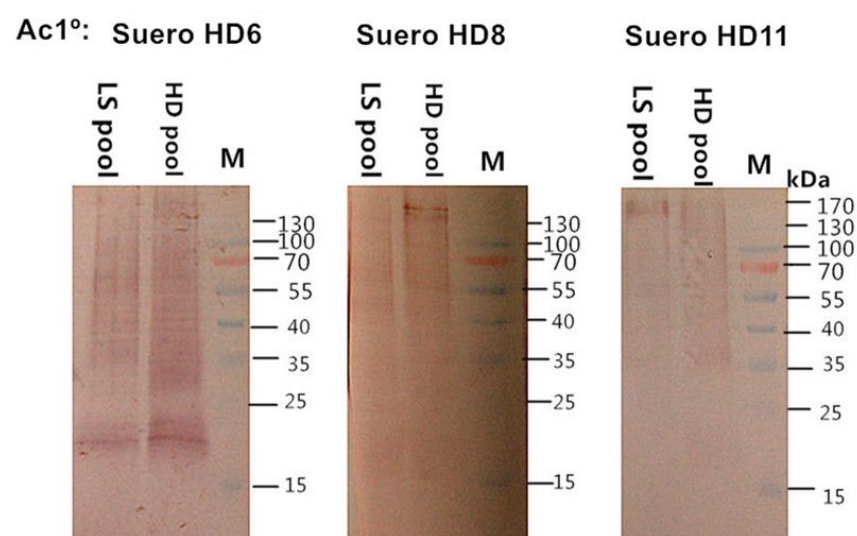


Figura 24: Western blot: reactividad de proteínas de microbiota a sueros de HD6, HD8, HD11. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

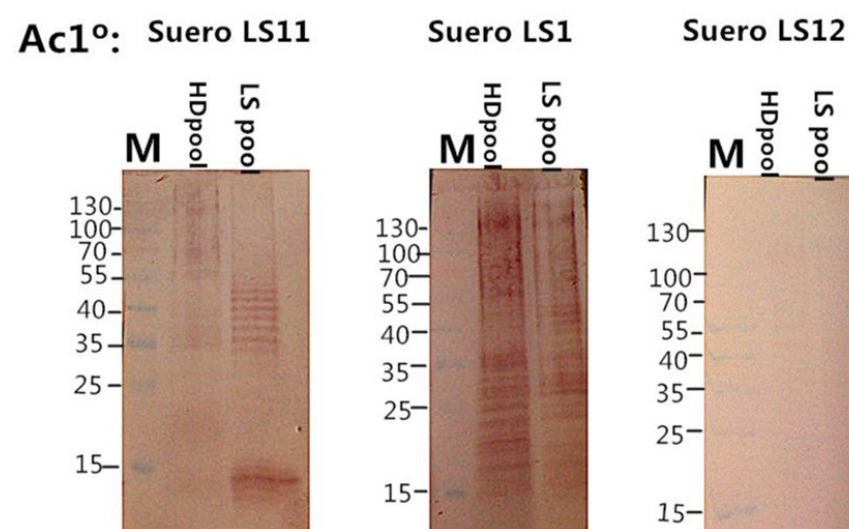


Figura 25: Western blot: reactividad de proteínas de microbiota a Sueros de LS11, LS1, LS12. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

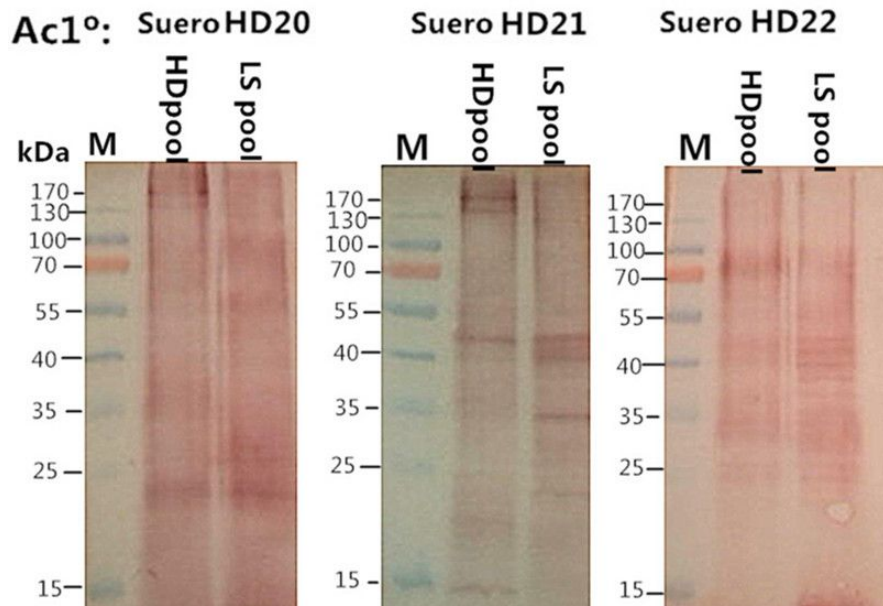


Figura 26: Western blot: reactividad de proteínas de microbiota a Sueros de HD20, HD21, HD22. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

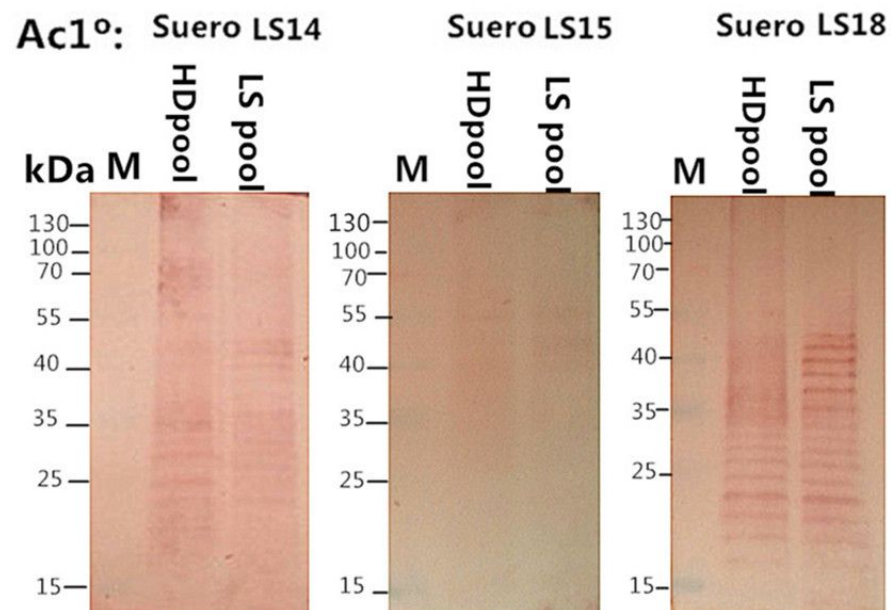


Figura 27: Western blot: reactividad de proteínas de microbiota a Sueros de LS14, LS15, LS18. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

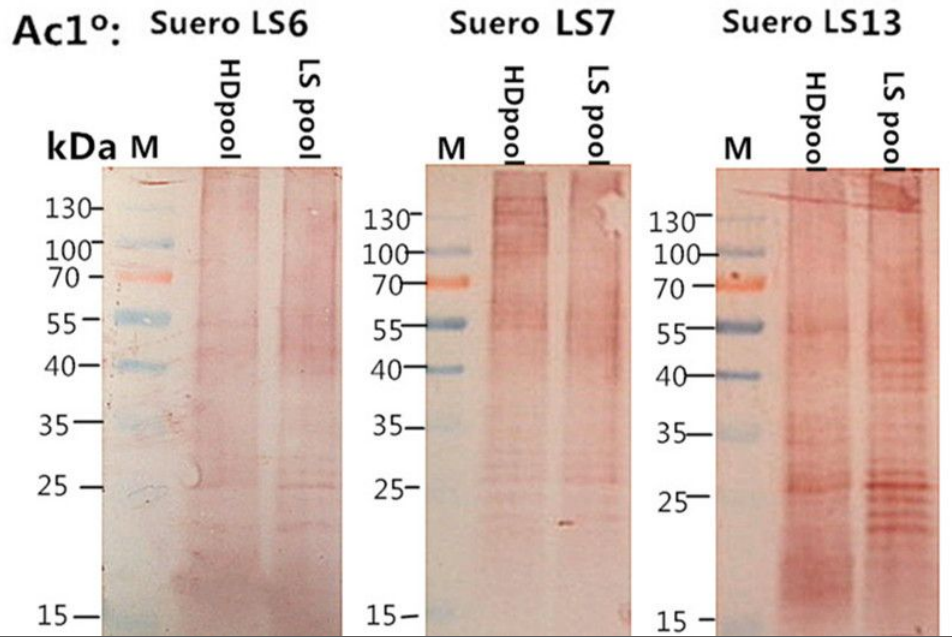


Figura 28: Western blot: reactividad de proteínas de microbiota a Sueros de LS6, LS7, LS13. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

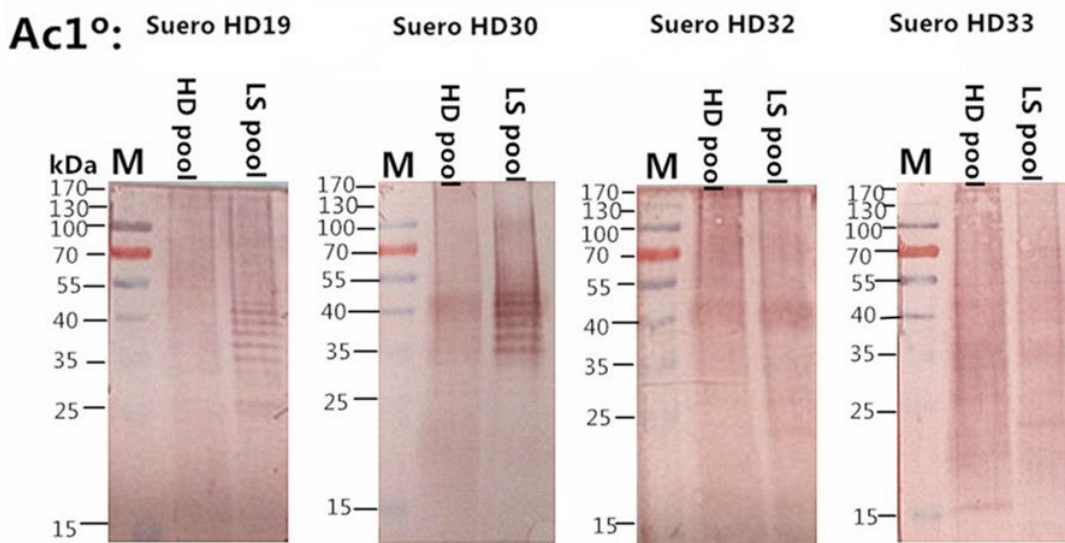


Figura 29: Western blot: reactividad de proteínas de microbiota a Sueros de HD19, HD30, HD32, HD33. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

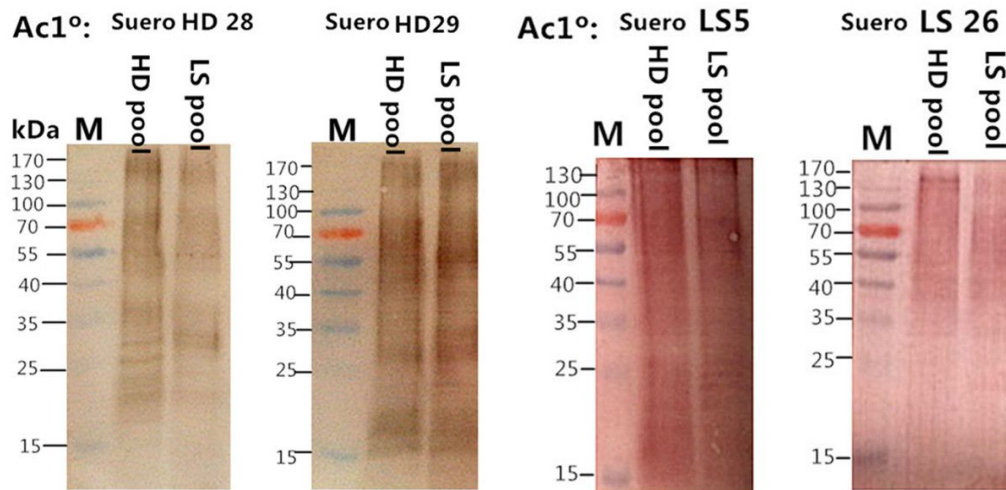


Figura 30: Western blot: reactividad de proteínas de microbiota a Sueros de HD28, HD29, LS5, LS26. Anticuerpo secundario anti-IgG-HRP 1:1500.

5. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo, del análisis de los resultados se pueden extraer varias conclusiones:

1. Los sueros de individuos con LES producen una inmunoreactividad frente a proteínas bacterianas intestinales diferente a la generada por sueros de individuos sanos.
2. Existe una gran variabilidad en los perfiles de proteínas de microbiota de heces, tanto en individuos sanos como de pacientes con LES.
3. Las proteínas de individuos sanos presentaron mayor inmunoreactividad que las de individuos con LES, en lo que a IgA se refiere; en cuanto a lo que se refiere a anticuerpos IgG, ambos grupos presentaron similar inmunoreactividad aunque perfiles diferentes.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF. (1982). The revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277.
2. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105-108.
3. Moco S, Martin FP, Rezzi S. (2012). Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *J Proteome Res* 11: 4781-4790.
4. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488: 178-184.
5. Milani C, Hevia A, Feroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, Sanchez B, Cueimonde R, Sinderen D, Margolles A. (2013). Assessing the fecal microbiota: an optimized Ion Torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One* 8: e68739.
6. Agmon-Levin N, Mosca M, Petri M, Shoenfeld Y. (2012). Systemic lupus erythematosus one disease or many? *Autoimmun Rev* 11: 593-595.
7. Larsen N, Vogensen FK, van den Beg FWL, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5: e9085.

8. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. (2004). Decreased CD4⁺CD25⁺ T Cells in Peripheral Blood of Patients with Systemic Lupus Erythematosus 198–202,
9. Crispin JC, Martínez A, Varela JA. (2003). Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, Pages 273–276
10. Reveille JD, Moulds JM. (1998). Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: I. The effects of HLA class II, C4, and CR1 alleles, *socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset*. Volume 41, Issue 7, pages 1161–1172,
11. Apbuckle MT, Clain MC, Rubertone MV, Scofield RH. (2003). Development of autoantibodies before the clinical onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 349:1523-33
12. Båve U, Magnusson M, Eloranta ML, Perers A. (2003). FcγRIIIa Is Expressed on Natural IFN-α-Producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) and Is Required for the IFN-α Production Induced by Apoptotic Cells Combined with Lupus IgG. *The Journal of Immunology*, 171 no. 6 3296-3302
13. Niewold TB, Hua J. (2007). High serum IFN-α activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes and Immunity* 8, 492–502
14. Icaza-Chávez ME et al. (2012). The intestinal microbiota in health and disease *Revista de Gastroenterología de México* ;77(Supl 1):23-25
15. Draganov PV. (2009). Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol.* ;15: 81-5.

16. Penders J, Thijs C, Vink C. (2006). Factores influenciando la composición de la microbiota intestinal en la infancia temprana. *Pediatrics*;118: 511-21.
17. Guarner F. (2011). Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterol Hepatol* ;34(3):147—154
18. O'Hara AM, Shanahan F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*.7:688—93.
19. Guarner F, Malagelada JR. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*. 361:512—9.
20. Adu D, Cross J, Jayne DRW. (2001). Tratamiento del lupus eritematoso sistémico con micofenolato mofetil. *Lupus* ;10:203-208
21. Tian XP, Zhang X. (2010). Involvement gastrointestinal in systemic lupus erythematosus: insight into pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol*; 16:2971.
22. Segura C, Franco JF. (2003). Enfermedad autoinmune e infección : una relación bidireccional: *Rev Clin Esp* 203: 167-9
23. Tello AG, Martínez AV, González Fernández AF. (2002). Manifestaciones hematológicas en el lupus eritematoso sistémico, *An.Med.Interna (Madrid)* 19:539-43
24. Bibiloni R, Chieh MM, Chou J, Nestlé A. (2009). Microbiota intestinal, obesidad y diabetes [Esp] ;67:39–48
25. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*; 308: 1635–1638.

26. Hold G, Pryde S, Russel V. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol*; 39:33–39.
27. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. (2002). Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* ; 46: 535–548.
28. Bengmarck S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic microbiota. *Gut*. 42, 2-7.
29. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHS. (1998). Overview of gut microbiota and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 41, 85-101.
30. Gema RR, Miguel VG. (2010). Biomarcadores para uso clínico; *Informe de vigilancia tecnológica*. 3, 95 – 80.
31. Ommen BV, Keijer J, Heil SG, Jim Kaput J. (2009). Challenging homeostasis to define biomarkers for nutrition related health. *Mol. Nutr. Food Res* , 53, 795 – 804
32. Bonassi S, Neri M, Puntoni R. (2001). Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat. Res*, 480–481, 349–358.
33. Ehlers MR. (2008). Pacific Biomarkers, Inc. *Biomarkers in Medicine*, 2(3):221-217
34. Munno DI. (2004). Risk factors for osteoporosis in female patients with lupus Erythematosus, *Lupus* 13:724-30.