

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**Uso de anticuerpos contra proteínas
extracelulares de bacterias de la microbiota
intestinal como Biomarcadores de
Enfermedad Inflamatoria Intestinal**

PROYECTO FIN DE MASTER

POR

ARANCHA HEVIA GONZÁLEZ

JUNIO 2012





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

Dr.D. Abelardo Margolles Barros (IPLA-CSIC)

Dr. D. Borja Sánchez García (IPLA-CSIC)

CERTIFICAN:

Que Dña. Arancha Hevia González ha realizado bajo mi dirección el Proyecto de Investigación al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, promoción 2011-2012.

Oviedo, 22 de junio de 2012

D. Abelardo Margolles

D. Borja Sánchez

D.Manuel Rendueles

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis tutores del Proyecto Abelardo Margolles y Borja Sánchez por darme la oportunidad de realizar este trabajo con ellos, en el Grupo de Probióticos, Prebióticos y Exopolisacáridos del Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos del IPLA-CSIC, en Villaviciosa.

Gracias especialmente a Borja por todo el tiempo empleado conmigo. También gracias a mis compañeros de laboratorio, tanto becarios como técnicos, que me ayudaron a integrarme y sentirme una más en el grupo.

Agradezco tanto a Carlos Bada como a Clara González de los Reyes-Gavilán el haberme aceptado en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias, en Villaviciosa, centro perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC.

Muchas gracias a mi tutor del Proyecto en el Máster, Manuel Rendueles de la Vega, que para los estudiantes nos supuso una grandísima ayuda a lo largo de todo el curso en infinidad de ocasiones; gracias por todo Manuel.

Gracias a mis padres, a mi hermano, y a mis abuelos, por su apoyo incondicional en los buenos y en los malos momentos, y por estar ahí. Muchas gracias por lo que siempre me habéis enseñado en la vida.

También quiero agradecer a mis compañeros del Máster, ya que sin ellos el curso no habría sido igual; gracias por todos esos momentos de cafetería juntos. Buena suerte a todos en el futuro.

Índice

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Bacterias del ácido láctico y proteínas extracelulares	10
1.2. Enfermedad inflamatoria intestinal: situación actual	12
1.3. Objetivos del proyecto	13
2. Consideraciones teóricas	15
2.1. La Enfermedad Inflamatoria Intestinal es un trastorno multifactorial:	15
2.2. Biomarcadores	17
2.3. Introducción a la inmunología y generación de anticuerpos.....	21
Sistema Inmune Innato	21
Sistema Inmune Adaptativo	23
Síntesis de Anticuerpos	24
2.4. Proteínas extracelulares de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	27
2.5. Electro-transferencia de proteínas y Western Blot.....	28
2.6. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , ELISA).....	32
3. MATERIAL Y METODOS	36
3.1. Condiciones de cultivo y cepas utilizadas	36
3.2. Fraccionamiento y separación de proteínas extracelulares	37
3.3. Análisis de la reactividad sérica a las proteínas extracelulares bacterianas mediante Western-Blot	38
3.4. Purificación de la proteína CWH de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	39
3.5. Obtención de suero policlonal frente a la proteína CWH	40

3.6. ELISAs frente a los extractos bacterianos y al extracto proteico del MRS.....	41
3.7. ELISAs para la determinación de Igs totales.....	42
3.8. ELISAs frente a la CWH de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	42
3.9. Análisis bioinformático de la CWH y síntesis de un péptido específico.....	43
3.10. ELISAs frente al péptido CWHp.....	44
3.11. Métodos estadísticos.....	44
4. ANTECEDENTES.....	45
4.1. Fraccionamiento y separación de proteínas extracelulares.....	45
4.2. Análisis de la reactividad sérica a las proteínas extracelulares bacterianas mediante Western-Blot.....	46
4.3. Objetivos.....	48
5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION.....	50
5.1. ELISAs frente a extracto bacteriano y de MRS.....	50
5.2. ELISAs para la determinación de Igs totales.....	51
5.3. Purificación de la proteína CWH de <i>Lb. rhamnosus</i> GG.....	52
5.4. ELISAs frente a la CWH de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	53
5.6. Análisis bioinformático de la CWH y síntesis de un péptido específico.....	60
5.7 .ELISAs frente al péptido CWHp.....	61
6. CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64

RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno de salud del que todavía no se conocen las causas y que comprende dos variantes: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se sabe que la microbiota intestinal humana, que comprende bacterias utilizadas en alimentación, juega un papel muy importante en el desarrollo de esta patología. Esta microbiota interactúa con el sistema inmune del huésped de manera anormal, existiendo un desequilibrio entre especies bacterianas beneficiosas y patógenas que favorece la aparición de la enfermedad. Los individuos que padecen la EII presentan niveles altos de anticuerpos contra antígenos propios de la microbiota, que se generan como resultado de esa respuesta inmune anómala. En este trabajo se pretende utilizar los niveles de anticuerpos dirigidos contra bacterias ingeridas con los alimentos, representantes también de la microbiota intestinal, como posibles biomarcadores de EII, con el fin de facilitar el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico precoz.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a health disorder of unknown origin with two variants: Crohn's disease and ulcerative colitis. It has already been established that intestinal human microbiota plays a very important role in the development and establishment of this pathology, where an imbalance between beneficial and pathogen bacterial species leads to an abnormal interaction with host immune system. Some of the bacterial species present in the gut microbiota are also used in human nutrition. In addition, some genetic factors predispose to IBD. The aim of this project was to use the levels of antibodies against food bacteria as potential biomarkers for IBD. This will allow developing better methods for an early diagnose of IBD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: factores que contribuyen a padecer enfermedad inflamatoria intestinal, e interrelaciones entre ellos. Pag. 16.

Figura 2: tipos de biomarcadores en función de su naturaleza molecular: genómicos, proteómicos, metabólicos, y transcriptómicos (ARN), y su relación con el fenotipo final del individuo. Pag. 18.

Figura 3: estructura de inmunoglobulinas, sus sitios de interacción con los antígenos y sitios de activación de sus funciones. Pag. 25.

Figura 4: isotipos de inmunoglobulinas en humanos, estructura y función. Pag. 26.

Figura 5: montaje experimental del sándwich en la cubeta de electroforesis para Western Blot. Pag 28.

Figura 6: esquema del proceso de electro-transferencia de proteínas en Western Blot. Pag. 29.

Figura 7: esquema de la interacción entre el antígeno, el anticuerpo primario y el secundario unido a HRP; reacción colorimétrica catalizada por la HRP. Pag 31.

Figura 8: esquema de una reacción de ELISA indirecto y fotografía de una placa microtiter. Pag. 33.

Figura 9: esquema de una reacción de ELISA sándwich. Pag. 34.

Figura 10: perfiles de proteínas extracelulares de las bacterias utilizadas en este estudio. Pag. 45.

Figura 11: análisis mediante Wester blot de la inmunreactividad sérica a proteínas extracelulares bacterianas de los sueros de individuos según los tres grupos de este estudio: Control, EC y CU. Pag 47.

Figura 12: distintos perfiles de inmunoreacción a las proteínas extracelulares, correspondientes a los sueros de distintos individuos control (C) o pacientes (P). En todos los casos se valoró la presencia de IgAs específicas. La banda inmunoreactiva correspondiente a la CWH de *Lb. rhamnosus* GG, se indica con flechas negras. Pag. 48.

Figura 13: perfiles de proteínas extracelulares de LGG, y esquema de la electroelución y purificación de CWH de *Lb. rhamnosus* GG. Pag. 53.

Figura 14: títulos determinados para IgG e IgA en distribución de dos grupos: control y enfermedad inflamatoria intestinal. Pag. 57.

Figura 15: títulos de IgG e IgA en distribución de tres grupos de individuos: control, EC y CU. Pag. 58.

Figura 16: resultado del alineamiento de secuencia realizado para la proteína CWH (p75 o Msp2) de *Lb. rhamnosus* GG frente al filo Firmicutes. Se recuadra en negro la zona de menor homología con el resto de especies, donde se escogió una región de 13 aminoácidos para el diseño del péptido CWHp. Pag. 61.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: resultados de los títulos de anticuerpos IgG e IgA frente a extracto bacteriano y frente a extracto de MRS de los sueros según su condición de enfermedad. Se representan las 3 réplicas del ensayo y la mediana. Pag. 50.

Tabla 2: título de IgG e IgA totales de los sueros de los dos grupos objeto de estudio: control y EII. Se muestra la dilución de los conjuntos de suero que se empleó y la absorbancia que resultó del ELISA para cada anticuerpo. Pag. 52.

Tabla 3: valores de los títulos de todos los individuos analizados por ELISA, distribuidos por su condición de enfermedad. Pag. 54.

Tabla 4: títulos de IgG e IgA de ocho individuos frente al péptido CWHp. Se muestra el título correspondiente que presentó frente a la proteína completa CWH. Pag. 62.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

Ag: antígeno

ANCA: anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos

ASCA: anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibody

BAL: Bacterias del ácido láctico

Cadena H: cadena pesada de la inmunoglobulina

Cadena L: cadena ligera de la inmunoglobulina

CAPS: ácido N-ciclohexil-3-aminopropanesulfónico

CU: colitis ulcerosa

CWH: *cell wall hydrolase*; hidrolasa de pared celular

CWHp: péptido específico de cell wall hydrolase.

DAB: tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobenzidina

DAS: *double antibody* sándwich

EC: enfermedad de Crohn

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

Fc: fragmento constante de la inmunoglobulina

HRP: peroxidasa de rábano

IgA: inmunoglobulina A

IgG: inmunoglobulina G

LB: linfocitos B

LT: linfocitos T

MALT: tejido linfoide asociado a mucosa

MRS: de Man, Rogosa y Sharpe

MRSC: MRS suplementado con L-Cisteína

Msp1: *major secreted protein 1*

Msp2: *major secreted protein 2*

OmpC: porina C de la membrana externa de *Escherichia coli*

PAB: anticuerpos contra el páncreas exocrino

PBS: *buffer* fosfato salino

PBST: *buffer* fosfato salino-Tween

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

PVDF: polifluoruro de vinilideno

RT: *room temperature*; temperatura ambiente.

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TCA: ácido tricloroacético

TCR: receptor de la célula T

TGI: tracto gastrointestinal

TMB: 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina

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. Bacterias del ácido láctico y proteínas extracelulares

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, principalmente de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, pero entre los que algunos autores incluyen, desde un punto de vista funcional, a otros microorganismos, como los géneros *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*. Las BAL han formado parte de la nutrición humana desde tiempos ancestrales, estando involucradas en la producción de un número amplísimo de productos fermentados. Estos alimentos fermentados juegan un papel importante en los hábitos humanos. Las BAL eran inicialmente las responsables de fermentaciones espontáneas en los alimentos, y algunas cepas fueron seleccionadas por los humanos con el propósito de controlar estos procesos espontáneos. Muchas especies de BAL se consideran organismos QPS (Qualified Presumption of Safety) o GRAS (Generally Regarded As Safe), según las legislaciones Europeas o Americana, y forman parte de alimentos y bebidas fermentadas destinadas a la nutrición humana. La producción de ácido láctico provoca un descenso del pH que contribuye a evitar la colonización por microorganismos patógenos y alterantes, prolongando la vida útil de estos alimentos.

Durante el siglo XX, el trabajo de microbiólogos como Metchnikov, Jensen, Cheplin, y Rettger proporcionó las primeras evidencias de que algunas cepas de bifidobacterias podrían ejercer efectos beneficiosos en la salud humana. Algunos de estos microorganismos fueron considerados como probióticos (Araya y cols., 2002). En una de sus últimas definiciones (2006) la FAO/WHO definió probiótico a “un microorganismo vivo que administrado en cantidades adecuadas ejerce un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador”. La mayoría de los probióticos que se

consumen son BAL residentes habitualmente en el tracto gastrointestinal, mayoritariamente *Lactobacillus* y cepas del género *Bifidobacterium*.

En los últimos tiempos ha emergido un interés creciente por la inclusión de cepas probióticas en la formulación de alimentos y suplementos, y hoy en día se puede encontrar en todo el mundo una amplia y creciente variedad de productos comerciales que los contienen (Sánchez et al., 2009a). Los probióticos pueden ejercer muchos efectos beneficiosos en la salud humana, como la regulación del balance favorable de la microbiota que coloniza de manera normal el intestino (Salminen & Gueimonde, 2004). Por ejemplo, en ciertas enfermedades autoinmunes, se ha demostrado que existe un desequilibrio entre microorganismos comensales beneficiosos y perjudiciales, fenómeno que se denomina disbiosis (Sartor, 2008; Qin y cols., 2010).

Los probióticos ingeridos con los alimentos ejercen dichos efectos saludables a través de distintos mecanismos: por la producción de compuestos beneficiosos, por la modulación de otras poblaciones microbianas intestinales, y por interacciones que se establecen con las células eucariotas humanas (células del epitelio intestinal y células del sistema inmune). Los mecanismos moleculares responsables de las interacciones de bacterias de los alimentos con las células eucariotas del intestino todavía no están sin embargo del todo claras. Se ha propuesto que algunas de estas interacciones están mediadas por proteínas extracelulares y por proteínas asociadas a la membrana de la bacteria (Sánchez y cols., 2010). La producción de proteínas extracelulares solubles por parte de las BAL puede estar influenciada por factores ambientales. Por esto dichas proteínas podrían pasar inadvertidas en las condiciones controladas de laboratorio en comparación con la situación *in vivo* en el tracto gastrointestinal (TGI).

1.2. Enfermedad inflamatoria intestinal: situación actual

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una inflamación crónica de la mucosa del tracto gastrointestinal. Dependiendo de la severidad y de la localización de las heridas, se distinguen dos formas principales de la enfermedad: enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). A día de hoy no existe cura ni datos concluyentes sobre los factores que desencadenan la enfermedad.

Tras muchos años de experiencia clínica se ha visto que la EII está asociada, en la mayoría de casos, con la generación de anticuerpos generados contra distintas biomoléculas como son los mananos extracelulares de *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), contra la proteína porina C de la membrana externa de *Escherichia coli* (anti-OmpC), o contra la flagelina de algunos miembros del cluster XIV del género *Clostridium* (Schoepfer y cols., 2009). La presencia de estos anticuerpos, conjuntamente con algunos anticuerpos específicos dirigidos contra estructuras del hospedador [como anticuerpos contra el páncreas exocrino (PAB), o anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrofilos (ANCA)], se utilizan como biomarcadores para la presencia de EC o CU (Schoepfer y cols., 2009). Sin embargo, se ha sugerido también que la presencia normal de uno u otro tipo de anticuerpos pueda llevar a una sobreestimación de los casos de EII (Davis y cols., 2007).

Además de las respuestas serológicas, existen alteraciones genéticas ligadas a la enfermedad, como mutaciones en el gen *nod2/card15*, que se encuentran en un 20-40% de enfermos de Crohn europeos y americanos, y que se sabe que pueden incrementar el riesgo de padecer EC (Manukyan y cols., 2008)

La hipótesis de este trabajo se basa en dos hechos: primero, los pacientes de EII muestran una respuesta inmune sistémica aberrante dirigida contra la microbiota intestinal (Furrie y cols., 2004); y segundo, el tipo de alimentos ingeridos en la dieta juega un papel fundamental en el proceso de inflamación intestinal (Bogaerde y cols., 2002). De esta forma, se puede establecer la hipótesis de que la anormal respuesta inmune innata y adaptativa se podrían haber desarrollado en individuos con EII en respuesta a bacterias y probióticos ingeridos en alimentos, debido a fallos en los mecanismos de tolerancia intestinal o a defectos en la permeabilidad de la mucosa intestinal.

1.3.Objetivos del proyecto

Nuestro objetivo con este trabajo ha sido estudiar el conjunto de proteínas extracelulares producidas por bacterias de los alimentos y bacterias probióticas y establecer la presencia de anticuerpos dirigidos contra ellas como potenciales biomarcadores de las diferentes formas de EII. Hemos centrado nuestro trabajo en estas proteínas extracelulares puesto que, debido a su secreción al exterior celular, podrían ser mediadoras del dialogo molecular entre bacteria-hospedador (Lebeer y cols., 2010). Es por tanto posible que ciertas proteínas extracelulares bacterianas, secretadas en el intestino, alcancen la mucosa intestinal e interaccionen con las células del hospedador.

Varios estudios inmunológicos han mostrado que el sistema inmune sistémico, en el contexto de EII, reacciona de manera diferente produciendo respuestas específicas en forma de InmunoglobulinaA (IgA) e InmunoglobulinaG (IgG) hacia muchos microorganismos que componen la microbiota de nuestro intestino (Furrie y cols., 2004). De hecho, se sabe que la translocación bacteriana en EC es un factor de

desarrollo de la enfermedad, e incluye una fuerte respuesta de IgG contra bacteria comensal (Adams y cols., 2008). Como también se dijo antes, los alimentos son un factor de gran importancia en el desarrollo de EII y por tanto las bacterias contenidos en esto.

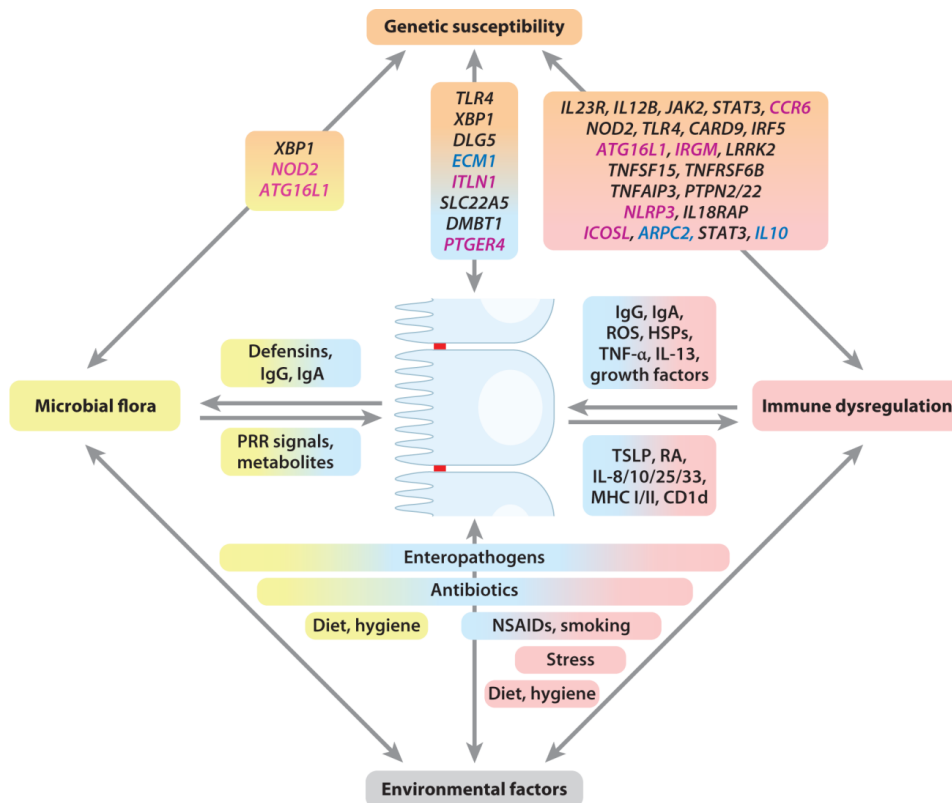
Como apuntamos anteriormente, algunos autores sugieren que la presencia normal de uno u otro tipo de anticuerpos pueda llevar a una sobreestimación de los casos de EII. Por lo que **el objetivo de este trabajo ha sido delimitar si los niveles de anticuerpos contra proteínas extracelulares de bacterias probióticas y de alimentos podrían ser distintos en el contexto de EC o CU, comparados contra una población sana.**

2. Consideraciones teóricas

2.1. La Enfermedad Inflamatoria Intestinal es un trastorno multifactorial:

La teoría más aceptada en la actualidad sobre la etiología de la EII contempla la enfermedad más bien como un grupo heterogéneo de enfermedades, que tienen como manifestación final la inflamación intestinal y en el que juegan un papel importante factores tanto genéticos como ambientales. En este sentido, la exagerada respuesta inmunológica se produciría en los individuos genéticamente predispuestos contra antígenos bacterianos, alimentarios, etc., presentes habitualmente en la luz intestinal . Pero aun así es posible que fenómenos de autoinmunidad cruzada, a través de mecanismos de mimetismo molecular, desempeñen un papel importante en la fisiopatología de la inflamación.

Así la predisposición genética, factores ambientales como dieta, estrés o ingesta de antibióticos, la flora intestinal del individuo y su sistema inmunitario se consideran elementos que combinados generan EII. Además, estos factores se regulan entre ellos de múltiples maneras, como se muestra en el siguiente esquema:




 Kaser A, et al. 2010. Annu. Rev. Immunol. 28:573–621

Figura 1: factores que contribuyen a padecer enfermedad inflamatoria intestinal, e interrelaciones entre ellos. En texto morado se muestran los polimorfismos en genes específicos de EC, en azul los específicos de CU y en negro los asociados con ambas enfermedades. El resto de abreviaturas corresponden a: HSP, proteínas de choque térmico; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; NSAIDs, antiinflamatorios no esteroideos; PRR receptor de patrón de reconocimiento; RA, ácido retinoico; ROS, especies reactivas de oxígeno; TSLP, linfopoyetina tímica estromal.

A la luz de diversos resultados experimentales en modelos animales se sabe que la EII conduce a una determinada composición de la microbiota comensal. A este respecto, no se sabe si una sola especie de bacteria podría ser el agente causante de la enfermedad. Sin embargo, los individuos que sufren de EII exhiben una disbiosis o alteración de la composición de su microbiota intestinal (Jansson y cols., 2009). Por ejemplo, se ha

descrito recientemente que los pacientes de EC presentan un mayor número de *E. coli* y una menor cantidad de *Faecalibacterium prausnitzii* en su intestino (Willing y cols., 2009). De hecho, esta última especie comienza a perfilarse como un futuro tratamiento probiótico de la enfermedad.

2.2. Biomarcadores

Un biomarcador biológico, o simplemente biomarcador, es una molécula biológica cuya presencia puede indicar un estado de enfermedad, una alta probabilidad o riesgo de desarrollarla, o un fenotipo específico de enfermedad. 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.

Históricamente, los biomarcadores utilizados en práctica clínica fueron en inicio indicadores fisiológicos como la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca o la temperatura corporal. Estos marcadores son fácilmente accesibles por lo que pueden ser medidos de manera sencilla, y se encuentran directamente relacionados con la fisiopatología de la enfermedad. Los avances que se produjeron en el s. 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, y diferentes tejidos. Como ejemplos tenemos los niveles de glucosa en sangre, colesterol, y enzimas hepáticas. Actualmente la eclosión de las técnicas “-ómicas” (genómica, proteómica, metabolómica...) ha supuesto una nueva generación de biomarcadores moleculares que se sirven de dichas tecnologías para realizar un diagnóstico molecular de las enfermedades. Gracias al análisis molecular es

posible realizar una mejor estratificación, lo que se traduce en terapias individualizadas mucho más efectivas.

Hoy en día se clasifican los biomarcadores en cuatro grupos en base a sus características para su uso en práctica clínica: biomarcadores con valor diagnóstico, biomarcador con capacidad predictiva, biomarcador con utilidad pronóstica, y biomarcador de respuesta. También se pueden clasificar en base a su naturaleza molecular en biomarcadores génicos, proteicos o metabólico.

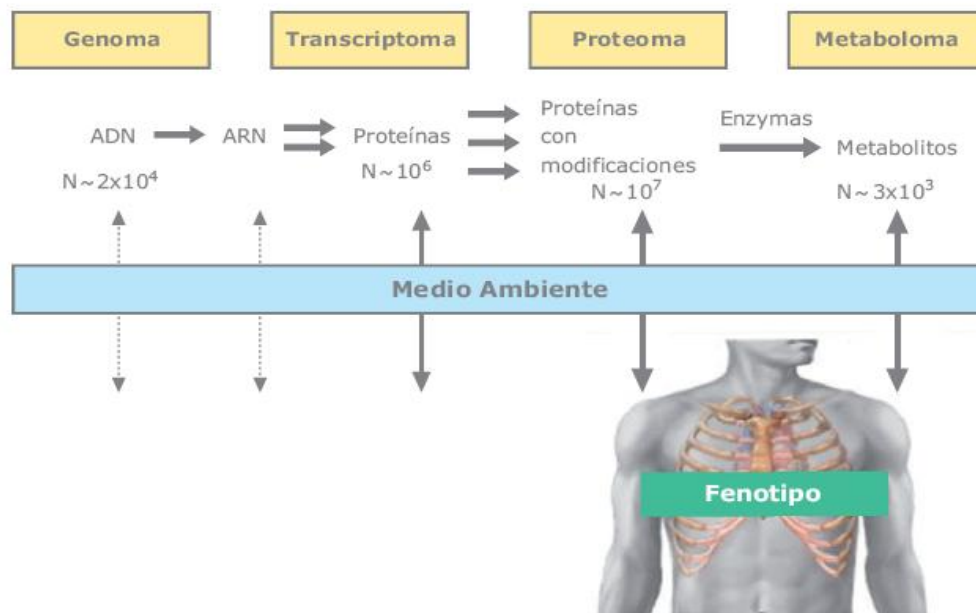


Figura 2: tipos de biomarcadores en función de su naturaleza molecular: genómicos, proteómicos, metabólicos, y transcriptómicos (ARN), y su relación con el fenotipo final del individuo.

El descubrimiento de un biomarcador puede resumirse en un proceso compuesto por dos etapas principales: una identificación en la que se reconocen las posibles moléculas o genes candidatos a convertirse en biomarcadores, y una fase de validación clínica del

biomarcador obtenido en la fase previa. Entre ambas etapas pueden existir pasos intermedios cuyo objetivo es incrementar al máximo la utilidad del ensayo (Paulovic y cols., 2008).

Durante la fase de identificación, en la que se centra nuestro proyecto, 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. El objetivo es conseguir relacionar una característica con un hecho biológico que tenga relevancia clínica o que esté relacionado con el estado de salud/enfermedad. Para ello se buscan diferencias genéticas, proteicas, o en los niveles de metabolitos 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.

Los principales cuellos de botella que pueden surgir en esta etapa del proceso son fundamentalmente problemas relacionados con cuestiones técnicas. Algunos de los principales retos técnicos característicos de esta fase del proceso de descubrimiento de nuevos biomarcadores serían hechos como: el bajo nivel de correlación que existe para algunos genes y sus traducciones a proteína, o lo que es lo mismo, entre el número de copias de ADN o ARN existentes y el nivel de proteínas que se traducen a partir de este material genético; el rango dispar de concentraciones de proteínas en sangre; dificultades de acceso y procesado de muestras en tejidos distintos del sanguíneo; dificultad para estudiar proteomas completos que puedan dar una idea global de un proceso biológico.

Debido al elevado número de candidatos a biomarcador que surgen en la etapa de identificación, convendría realizar un paso de priorización de candidatos antes de continuar; se trataría de dar prioridad a la investigación con aquellos candidatos que

muestren más posibilidades de tener una utilidad clínica real. La fiabilidad de los datos, su potencial valor clínico y el análisis bioinformático son algunos de los criterios que se deben contemplar en este paso.

A continuación es interesante realizar un paso de verificación previa a la validación. La verificación tendría por objetivo determinar si existe una evidencia científica lo suficientemente importante sobre la utilidad clínica del biomarcador como para continuar con el proceso. Para ello se deben realizar análisis estadísticos que evalúen el significado estadístico de las diferencias entre los valores obtenidos previamente en el estudio para individuos sanos y enfermos. Del mismo modo debe realizarse un estudio piloto, con un número de individuos más reducido que en el ensayo clínico, en el que se evalúen criterios de sensibilidad y especificidad. A partir de este punto, el coste de la investigación se encarece de forma muy notable debido a la puesta en marcha de los estudios de validación clínica, de ahí la importancia la etapa de verificación con estudios piloto.

Para que un biomarcador se considere completamente validado tiene que incorporarse a la rutina clínica. Para ello, ha de desarrollarse un test diagnóstico sencillo que detecte la presencia de biomarcador de manera precisa y robusta. Este proceso es largo y costoso, pudiendo llegar a ser tan complejo como el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco. Antes de introducir en la práctica clínica un nuevo test de diagnóstico es imprescindible cumplir ciertas obligaciones en cuanto a calidad de producción, y realizar una serie de valoraciones sobre: la eficacia, efectividad y eficiencia del test diagnóstico, impacto económico, impacto sobre la organización de los servicios sanitarios y los aspectos éticos y sociales que pueden acompañar a la introducción de la prueba dentro de dichos

servicios (Biomarcadores para uso clínico, GENOMA ESPAÑA/Fundación Universidad Autónoma de Madrid).

2.3. Introducción a la inmunología y generación de anticuerpos

El sistema inmune surgió a lo largo de la evolución de los vertebrados para combatir las infecciones causadas por microorganismos patógenos: bacterias, virus, hongos, protozoos y gusanos o helmintos. Este sistema ha desarrollado dos estrategias para luchar contra los microorganismos: el sistema inmune innato o inmediato y el sistema inmune adquirido o adaptativo, que a continuación tratamos por separado.

Sistema Inmune Innato

El sistema inmune innato lo conforman las barreras exteriores del organismo, piel, mucosa digestiva, respiratoria y genitourinaria, unas proteínas sanguíneas denominadas sistema del complemento, y unas células que bien pueden estar presentes en sangre o bien en tejido: macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. La respuesta innata elimina el 99% de los patógenos que contactan con el organismo porque reconoce estructuras moleculares conservadas que están presentes en familias o grupos enteros de patógenos. Destruye de forma inmediata las células que presentan este tipo de estructuras conservadas, pero no es específico contra ningún microorganismo concreto.

Las barreras exteriores aíslan al organismo del exterior previniendo infecciones; las células epiteliales, y las mucosas conforman una barrera mecánica (unión estrecha de células que impide el paso de microorganismos) , química (existencia de sustancias

químicas protectoras como el pH ácido, la lisozima lacrimal que destruye la pared celular de bacterias, o péptidos antibacterianos en el intestino) y microbiológica (bacterias comensales presentes en las mucosas compiten con los patógenos por el espacio, nutrientes, e incluso producen moléculas microbicidas) al paso de patógenos. El sistema del complemento son un conjunto de proteínas preformadas tanto en la sangre como en el líquido intersticial. Estas moléculas se activan ante patógenos, por ejemplo al reconocer el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, dan lugar a una cascada de reacciones entre ellas al final de las cuales agregan sobre la bacteria y forman poros en su bicapa lipídica produciéndose la muerte de la misma.

Los macrófagos son células que se encuentran en todos los órganos y tejidos, siendo más abundantes debajo de piel y mucosas y en el bazo. Su función es fagocitar los patógenos que entren, y lo hacen mediante el reconocimiento de estructuras a través de Receptores que poseen en su superficie, como el receptor de manosa o el receptor de lipopolisacárido.

En cuanto al resto de células, su función es apoyar a los macrófagos en infecciones de distintos tipos: los neutrófilos participan en infecciones bacterianas y por hongos, generando inflamación y fagocitosis, los eosinófilos producen respuesta inmune contra gusanos o helmintos y alergias, y secretan grandes cantidades de una proteína concreta por exocitosis, y los basófilos y mastocitos tienen grandes cantidades de moléculas proinflamatorias como la histamina, y colaboran en reacciones inflamatorias de emergencia. Además de estas, las células dendríticas son de vital importancia en cuanto a la defensa inmune, ya que este tipo de células son células presentadoras de antígenos, y generan la activación de los linfocitos.

El sistema inmune innato induce una respuesta inflamatoria cuando alguno de sus componentes reconoce a un patógeno. La inflamación es una respuesta defensiva o protectora que tiene como objetivo reclutar más células y más moléculas inmunológicas al lugar donde se originó la infección, para dificultar o parar el crecimiento del microorganismo y favorecer la reparación del tejido dañado. Como resultado de los procesos inflamatorios se genera una vasodilatación del vaso cerca del sitio de infección, para aumentar la permeabilidad vascular y así facilitar el tránsito de moléculas y células efectoras del sistema inmune que colaboran con los macrófagos en la destrucción del patógeno.

Aunque el sistema inmune innato elimina el 99% de microorganismos, su implicación no es suficiente ante la presencia de patógenos, ya que existen a veces algunos que no poseen estructuras conservadas, o pueden darse mutaciones que hagan que cambien.

Sistema Inmune Adaptativo

El sistema inmune adquirido o adaptativo produce una respuesta específica contra cada microorganismo. No es inmediato sino que requiere varios días en producirse ya que la respuesta adaptativa es inducida por la presencia del microorganismo. Genera memoria inmunológica, fenómeno que consiste en que una parte de las moléculas o células generadas específicamente contra el patógeno quedarán de retén o reserva para infecciones futuras contra el mismo patógeno. La respuesta adaptativa actúa a través de los linfocitos. Hay dos tipos de linfocitos, cada uno con sus receptores de membrana específicos: los linfocitos B (LB) con la inmunoglobulina (Ig), y los linfocitos T (LT) con el Receptor de la Célula T (TCR).

Se denomina antígeno (Ag) a cualquier molécula capaz de producir una respuesta específica a través de la activación de la Ig o del TCR. Las Igs reconocen a antígenos solubles y el TCR reconoce péptidos derivados de la digestión del patógeno que aparecen unidos a la superficie de las células presentadoras de antígenos que son las que han digerido o procesado al patógeno.

Un epítipo es la parte del antígeno que se une a la Ig o al TCR. Puede ser un epítipo lineal formado por una secuencia lineal en la estructura primaria del antígeno, o un epítipo conformacional formado por regiones separadas en la estructura primaria pero cercanas en la estructura secundaria.

Síntesis de Anticuerpos

Los LB operan por medio de un fenómeno denominado selección clonal. Normalmente existen muchos linfocitos (muchos clones) en el organismo, cada uno con su Ig específica que reconoce a un antígeno diferente, pero de cada linfocito específico no hay un gran número de células. Cuando un LB se encuentra con el antígeno específico de su receptor, lo que ocurre es que va a proliferar, dividirse (selección de un clon) y cuando llegan a ser un gran número de células del mismo clon se van a diferenciar a células plasmáticas. Estas células se diferencian de los linfocitos en que tienen el citoplasma muy desarrollado en detrimento del núcleo celular, y están produciendo masivamente la forma soluble de su receptor Ig: el anticuerpo (Ac).

La inmunoglobulina es por tanto, una proteína de membrana que forma parte del receptor antigénico de los linfocitos B, y los anticuerpos la forma soluble de la

inmunoglobulina. Las Igs tienen una pequeña región hidrofóbica que las ancla a la membrana lipídica del LB y que las células plasmáticas dejan de sintetizar.

Los anticuerpos son proteínas heterodiméricas formadas por cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos: dos son las llamadas cadenas pesadas, H, y dos las cadenas ligeras, L, que están unidas a las H por puentes disulfuro. Los anticuerpos se encuentran mayoritariamente en el suero.

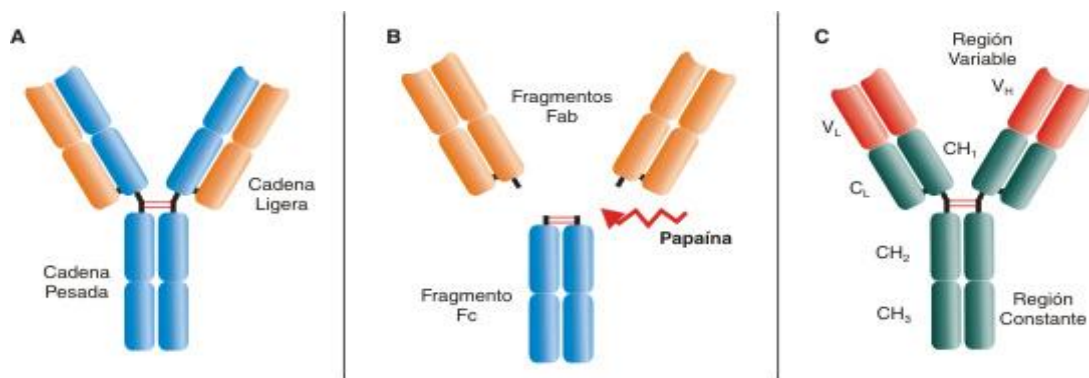


Figura 3: estructura de inmunoglobulinas (A). La interacción y reconocimiento del antígeno se produce a través de las regiones variables de la cadena H y la cadena L ($V_L + V_H$), y la activación de su función efectora a través de la región constante Fc (CH_2 y CH_3).

Existen dos tipos de cadenas L, la alfa, α , y la kappa, κ , que son funcionalmente iguales, y cinco tipos de cadenas H que dan los cinco isotipos de inmunoglobulinas: cadena pesada mu, μ que da lugar a IgM, cadena pesada delta, δ , que da IgD, cadena pesada gamma, γ que da lugar a IgG, cadena pesada alfa, α , que da IgA, y cadena pesada épsilon, ϵ , que da IgE. Cada isotipo tiene una función y distribución tisular diferente, y de los cinco el IgG es el isotipo más abundante (>75%).

A su vez pueden existir subtipos de Igs, por ejemplo IgG presenta cuatro subtipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la IgA presenta dos: IgA1 e IgA2.

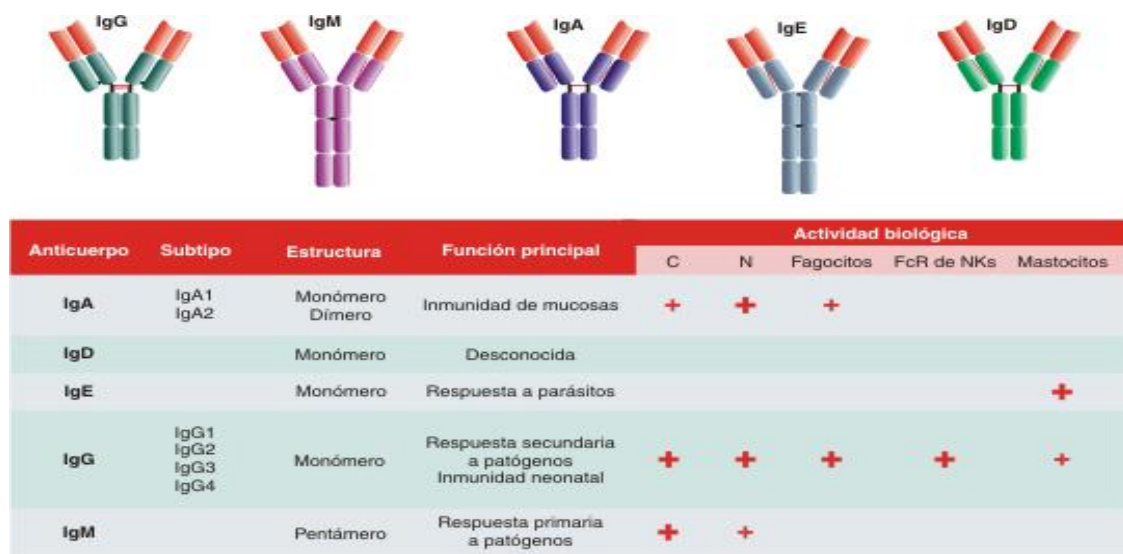


Figura 4: diversidad de isotipos de inmunoglobulinas, estructura y actividad efectora.

La IgG conforma más del 75% de las Igs séricas, y atraviesa la placenta confiriendo inmunidad pasiva al feto durante un tiempo. Su función principal es la de opsonizar al patógeno (marcarlo) para su reconocimiento por Macrófagos y otras células inmunológicas que puedan eliminarlo.

La IgA es la inmunoglobulina secretora (en concreto el subtipo IgA2) y se sintetiza en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Está presente en las secreciones externas: lágrimas, saliva, secreciones del tracto gastrointestinal, nasofaríngeo y genitourinario. Es el isotipo más abundante en leche materna. También supone el 10% de las Igs séricas (IgA1). La función principal de la IgA es neutralizadora: se une a antígenos y disminuye su capacidad de invasión. No activa a Macrófagos ni a proteínas del Sistema del Complemento.

2.4. Proteínas extracelulares de *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lb. rhamnosus GG es una cepa probiótica utilizada en alimentación humana. En España es comercializada por la empresa Kaiku en su producto Actif. A su vez, es la cepa bacteriana en el que se ha centrado este proyecto de máster. Hasta el momento, se conocen dos proteínas solubles que se secretan mayoritariamente por *Lactobacillus rhamnosus* GG: la hidrolasa de pared celular, Msp1 o p75, de 75kDa y 498 aminoácidos, y un homólogo a la proteína de *L. casei* ATCC 334, Msp2 o p40, de 40kDa, de función desconocida (Yan y cols. 2007; Claes y cols., 2012).

Las hidrolasas de pared o CWH (cell wall hydrolase) catalizan la escisión del polímero de azúcares de N-acetil-glucosamina y N-acetil-murámico que forman el peptidoglicano que compone la pared celular, o de las cadenas peptídicas de 3-5 aminoácidos que se pueden estar unidas al murámico, y tienen funciones importantes en la regulación del crecimiento de la pared celular bacteriana, multiplicación y mantenimiento, y también en la separación de células hijas. Además de por su especificidad de hidrólisis, las hidrolasas de pared difieren en su sitio de acción: pueden actuar en el septo o en toda la pared celular, y también en su momento de acción: durante la división celular o durante el crecimiento (Vollmer y cols. 2008)

En trabajos previos estas proteínas han demostrado que inhiben la apoptosis en líneas celulares mediada por citoquinas, promueven la homeostasis y crecimiento de las células epiteliales intestinales, y reducen el daño inducido por peróxido de hidrógeno en la barrera epitelial (Seth y cols., 2008). Más recientemente se ha desarrollado una Msp2 recombinante que puede mejorar la colitis experimental en ratones a través de un mecanismo de distribución dirigida al colon (Yan y cols., 2011).

2.5. Electro-transferencia de proteínas y Western Blot

El uso conjunto de estas dos técnicas permite la inmovilización de proteínas en un soporte sólido estable, y su análisis mediante métodos inmunológicos. En un proceso estándar, se carga un gel de SDS-PAGE (descrito más adelante en la sección material y métodos) con un marcador de masa molecular preteñido (para visualizar su migración), y 3 pocillos con 5, 10 y 15 μL de extracto purificado, correspondiéndose con cantidades de 2, 4, y 6 μg de proteína. Para la valoración de la concentración de proteína, puede recurrirse tanto a métodos colorimétricos (Lowry, ácido bicinonínico etc), o extrapolarla a partir de la absorbancia de residuos aminoácidos de triptófano (a 280 nm). Primero se separan las proteínas (SDS-PAGE) 1h a 170V constantes, en función de su masa molecular. Después se configura el sistema de sándwich de electrotransferencia con el gel, una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), y varias capas de papel de filtro y fibras, según se indica en las figuras 5 y 6.

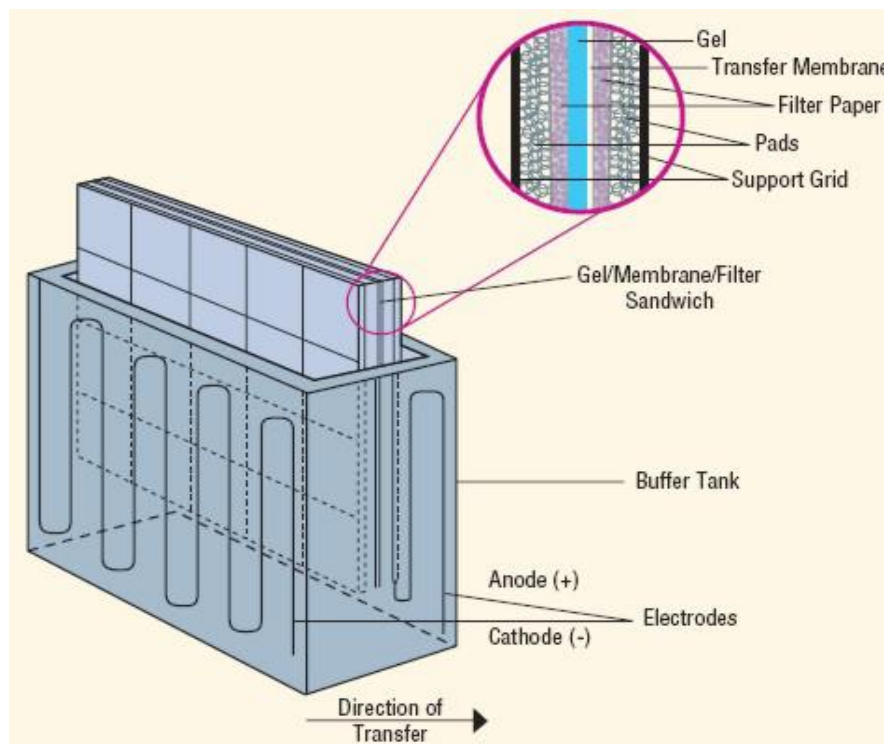


Figura 5. Montaje del sandwich en la cubeta de electroforesis.

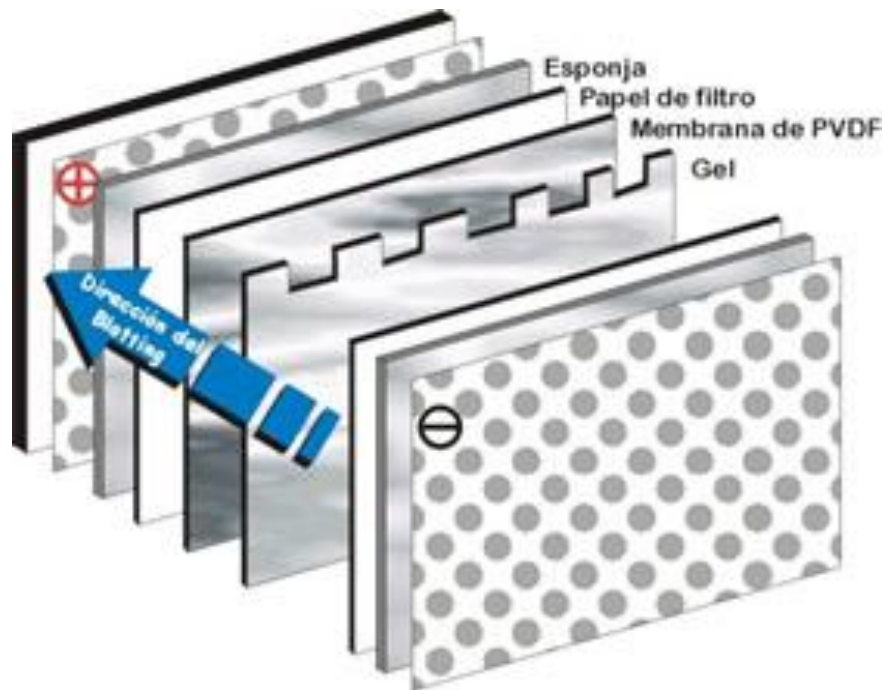


Figura 6. Esquema del proceso de electro-transferencia de proteínas desde el gel de electroforesis hasta la membrana.

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) 100mM. 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.

Después de esto se desmonta el sándwich, se separa la membrana, y se realizan una serie de incubaciones de la misma. Primero se le añade una disolución de bloqueo para evitar uniones inespecíficas de anticuerpos a la membrana. Esta solución es comúnmente leche desnatada al 5% (p/v) en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con Tween al 0,1% (v/v), aunque pueden utilizarse otras fuentes de proteína como

seroalbúmina bovina o bloqueantes comerciales. Para el bloqueo de la membrana, se incubaba al menos 10min a temperatura ambiente, o se deja toda la noche a 4°C.

A continuación, y en los casos experimentales que atañen al presente proyecto de máster, se añade una dilución de un pool de sueros de pacientes enfermos/sanos, diluidos en PBST con 5% (p/v) de leche desnatada. Estas diluciones del suero contendrán las inmunoglobulinas específicas del antígeno que queramos detectar (en este caso proteínas bacterianas) y se deja reaccionar 1h a temperatura ambiente. La posterior incubación con un anticuerpo secundario, que reconoce a la fracción constante Fc de la inmunoglobulina (anti-IgG o anti-IgA humana), diluido 1:5000 en PBST y con 5% (p/v) de leche desnatada, permitirá identificar la unión de inmunoglobulinas de tipo G (IgG) o de tipo A (IgA). Estos anticuerpos secundarios suelen tener conjugada, mediante enlace covalente, el enzima peroxidasa de rábano (HRP). El anticuerpo secundario se deja reaccionar una hora a temperatura ambiente. Un esquema de este proceso se refleja en la figura 7.

El último paso es el de revelado: para saber si el antígeno está presente realmente en la muestra, y se transfirió a la membrana, es necesario acoplar algún sistema que lo detecte. Una manera es, como decíamos, conjugando el enzima HRP al anticuerpo secundario, que se unirá al anticuerpo primario si, a su vez, se unió al antígeno. Este enzima se usa extensamente en aplicaciones bioquímicas por su habilidad de amplificar una señal débil, incrementando así la posibilidad de detectar una molécula diana. Otros enzimas utilizados son, por ejemplo, la fosfatasa alcalina.

La reacción que cataliza la HRP es la oxidación de un sustrato cromogénico en presencia de peróxido de hidrógeno, generando un producto coloreado insoluble que precipita sobre la membrana. Esta es una técnica que, además de su sencillez y de la

variabilidad de sustratos disponibles (que aumentan en mayor o menor medida la sensibilidad del análisis), no necesita ninguna instrumentación especial para la correcta visualización de los resultados. Existen otros tipos de sustratos que aumentan mucho más la sensibilidad, como los sustratos fluorogénicos, los quimioluminiscentes y los bioluminiscentes, pero tienen la contrapartida de que son más caros y de que en nuestro caso no proporcionan información extra. Por tanto, la HRP constituye el método de detección más barato y sencillo. 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 1ng de proteína con una incubación de 15-30 min).

Por tanto, y si la detección es exitosa, aparecerá un mayor o menor número de bandas inmunoreactivas en la membrana, en los sitios donde se haya transferido la proteína y donde se hayan unido anticuerpos presentes en el suero.

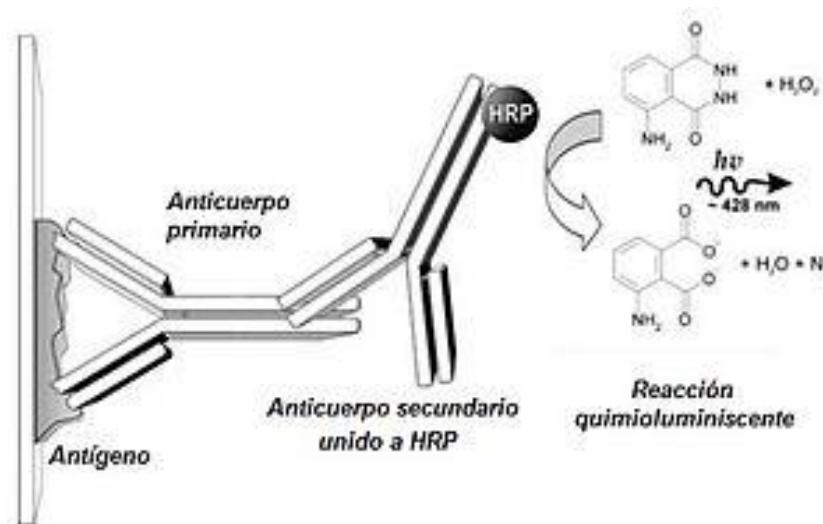


Figura 7. Esquema de la interacción entre el antígeno, el anticuerpo primario y el secundario unido a HRP; reacción colorimétrica catalizada por la HRP.

2.6. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA).

Para determinar el título de anticuerpos presente en suero de las personas utilizadas en este estudio, tanto sanas como afectadas por EII, se lleva a cabo la cuantificación mediante una técnica llamada Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, o ELISA.

El principio es similar al del *Western blotting*, interacción de antígeno, anticuerpo primario y anticuerpo secundario unido a HRP, pero la reacción se lleva a cabo en los pocillos de una placa microtítulo de 96 pocillos en los que se fija el antígeno (en el *Western* el antígeno se fijaba a una membrana de PVDF).

Si realizamos diluciones seriadas del suero de un individuo, irá sucesivamente disminuyendo la concentración de anticuerpos; el título de anticuerpo del suero será la última dilución del suero que da una reacción positiva, tomando como reacción posible la de: fijación de complemento, aglutinación en tubo y porta, inmunofluorescencia, o en nuestro caso Absorbancia.

Este es un método serológico que entra dentro de los llamados métodos de diagnóstico microbiológico indirecto: detección de un contacto con antígenos microbianos no por aislamiento e identificación del microorganismo causante sino a través de la respuesta del huésped.

Existen distintos tipos de ensayo ELISA:

- ELISA directo: este ensayo consta de tres etapas principales: se fija el antígeno en el soporte sólido, se lava, se incuba con el Ac secundario marcado con HRP, se lava, y finalmente se revela la reacción

- ELISA indirecto: consta de cuatro etapas: fijación del antígeno en el pocillo, incubación con Ac primario, luego con el secundario conjugado a HRP, y revelado con sustrato. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más utilizado, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permite cuantificar una gran variedad de antígenos, por eso es un método más polivalente y barato, aunque se pierda algo de precisión por tener un eslabón más con respecto al método directo. La dilución de la solución que contiene el anticuerpo primario (por ejemplo: suero sanguíneo) es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar la aparición de falsos negativos, ya que si la muestra está muy diluida no saldrá positiva si la titulación de anticuerpos es muy baja. Es decir, aunque los anticuerpos están presentes, la prueba no da positivo porque la concentración de anticuerpos específicos contra el antígeno que está pegado en el fondo del pocillo no es suficiente como para dar una señal detectable.

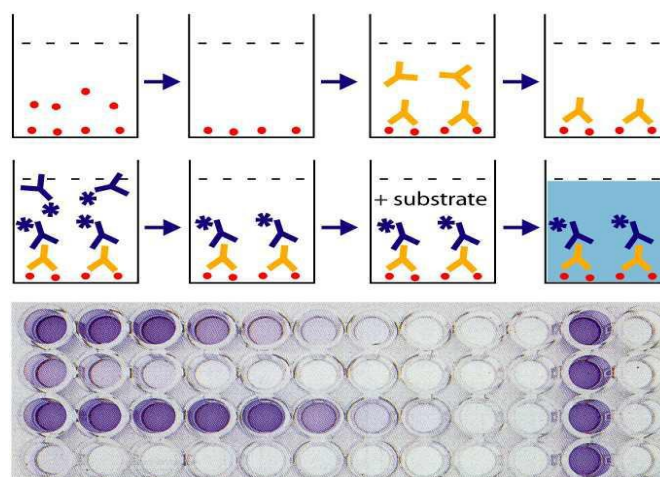


Figura 8: esquema de una reacción de ELISA indirecto y fotografía de una placa microtiter.

- ELISA indirecto sándwich o DAS (double antibody sándwich): en este tipo de ELISA se fija al soporte un anticuerpo primario que reconoce o captura al antígeno, después la muestra problema con el antígeno, que quedará unido al anticuerpo, posterior lavado, incubación con un segundo anticuerpo anti-antígeno, marcado con un enzima por ejemplo, lavado, y revelado con el sustrato del enzima. Este ensayo tiene una gran sensibilidad y especificidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.
- ELISA competitivo: este ensayo es un poco diferente a los anteriores; se realiza una incubación de la muestra donde está el antígeno con un anticuerpo primario sin marcar, antes de añadir esta mezcla al pocillo donde está inmovilizado el antígeno. Se lava y se añade un Ac secundario específico al primario y conjugado a un enzima, de tal manera que cuanto más antígeno en la muestra menos anticuerpo primario queda libre para unirse a antígenos del pocillo, de ahí la competición. Revelado de la reacción. Se generará más color cuanto menos antígeno haya en la muestra.

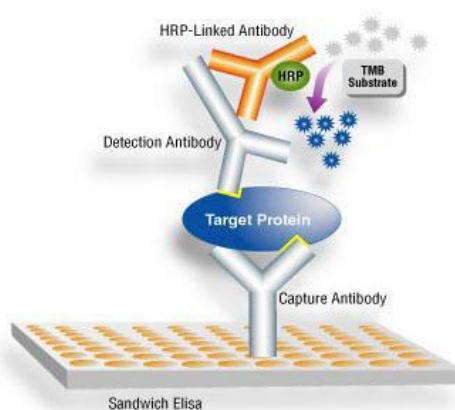


Figura 9: esquema de una reacción ELISA sándwich.

En industria alimentaria ya se utilizan kits ELISA comerciales para la detección de, por ejemplo, gluten en alimentos (el ELISA-R5 es el método de referencia para el análisis de gluten y fue desarrollado inicialmente en el Centro Nacional de Biotecnología por el Dr. Méndez y cols. El Codex Alimentarius ha adoptado como método recomendado para el análisis de gluten/gliadinas el uso de inmunoensayos basados en el anticuerpo R5, estableciéndolo como un método de tipo 1, el mayor grado de fiabilidad dentro del Codex) o micotoxinas en alimentos y piensos. En el campo de la práctica clínica existen innumerables ejemplos de utilización del ELISA; como ejemplo la determinación de presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH, agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA se realiza mediante esta técnica.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Condiciones de cultivo y cepas utilizadas

Para el aislamiento de proteínas extracelulares bacterianas se escogieron seis microorganismos utilizados en alimentación humana, siendo alguno de ellos probióticos. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809, *Bifidobacterium bifidum* LMG 11041 y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA 4549. Todas las cepas se crecieron en medio MRS, (de Man, Rogosa y Sharpe, autores que formularon el medio) (Difco®; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 55g/L, suplementado con L-cisteína al 0,05% (p/v) (MRSC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y con 1,8 % (p/v) de agar en los casos necesarios.

Las cepas, almacenadas en stocks a -80°C (MRSC suplementado con 40% (v/v) de glicerol), se sembraron (5µL) por estría en placas de MRSC agar, y se incubaron a 37°C durante 48h en anaerobiosis. Esto se realizó en una cámara de anaerobiosis modelo MG500 (Don Whitley Scientific, West 100 Yorkshire, UK) con una atmósfera formada por 10% (v/v) de H₂, 10% (v/v) de CO₂ y un 80% N₂. Con una colonia se realizaron precultivos en MRS líquido, y a partir de ellos se inocularon (1% v/v) volúmenes variables (50 o 400 mL) de MRSC fresco. Estos cultivos se incubaron a 37°C durante 24h, también en anaerobiosis. Al día siguiente los cultivos se centrifugaron (9000 g, 30 min), se recuperaron los sobrenadantes, y los pellets se almacenaron para posteriores análisis como stock de los microorganismos. Estos stocks también se elaboraron en MRSC suplementado con glicerol 40% (v/v) a -20°C.

3.2. Fraccionamiento y separación de proteínas extracelulares

Para el aislamiento de proteínas extracelulares se siguió el protocolo descrito por Sánchez y colaboradores (2009). En primer lugar se crecieron las distintas cepas bacterianas en medio MRSC-agar para comprobar su pureza como se describió en el apartado anterior. Para ello se sembraron 15 µL del stock en la placa y se incubó a 37°C durante 48 h en anaerobiosis. Tras verificar la morfología al microscopio óptico, se sembró una colonia de cada cepa en 10 mL de MRSC, se incubaron durante 24 h a 37°C y a partir de ahí se inocularon 50 mL de MRSC fresco (1% v/v), que volvieron a incubarse durante 24 h a 37°C. Tras este tiempo, todos los cultivos se encontraban en fase estacionaria temprana. De este experimento y para cada cepa se realizaron, al menos, tres replicados biológicos.

Los cultivos se centrifugaron (10000 g, 21°C, 5 min), se recuperaron los sobrenadantes y se precipitaron las proteínas mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 6% (p/v), incubándolo toda la noche a 4°C. El precipitado resultante se purificó mediante dos lavados con 800µl de acetona (9000 g, 4°C, 10 min). Los pellets se secaron durante unas horas a 37°C en un termo-bloque. Las proteínas extracelulares contenidas en el precipitado se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5 %) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1971). Para ello, el precipitado proveniente de 50 mL de cultivo se resuspendió en 200µl de buffer de carga 5X mediante ultrasonidos (15 min), se centrifugó (16000 g, 21°C, 5 min) para precipitar proteínas no solubilizadas, y se cargaron 15 µl en cada pocillo del gel, lo que equivale a unos 40 µg de proteína (Sánchez y cols., 2009) Como marcador de masa molecular se utilizó el Page Ruler Prestained (Thermo-Scientific).

La migración de las proteínas se realizó utilizando un tampón de electroforesis compuesto de SDS (1 g/L), TRIS (3 g/L) y glicina (15 g/L) a pH=8,7, en el que se sumerge el gel de poliacrilamida. El sistema se dejó migrar, en todos los casos, a una intensidad constante de 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 comercial (Pierce Blue Safe stain).

3.3. Análisis de la reactividad sérica a las proteínas extracelulares bacterianas mediante Western-Blot

Este análisis se realizó sobre una colección de sueros, proporcionados por la Dra. Ana Suárez, del Área de Inmunología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. Esta colección constó de 50 muestras de individuos sanos, 37 muestras de individuos con Enfermedad de Crohn y 15 muestras de individuos con Colitis Ulcerosa. Para la detección de bandas inmunoreactivos en los extractos de proteínas extracelulares, se hicieron migrar 40 µg en un sistema SDS-PAGE uno como se describió anteriormente. Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) durante 30 min a una diferencia de potencial constante de 50 V (en un sistema de Amersham Biosciences). 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 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron, bien con pools de sueros de los distintos grupos, bien con sueros individuales (diluidos 1:100 en PBST-L), durante toda la noche a 4°C con una agitación ligera. Las membranas se lavaron 4 veces con PBST, y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano [*horseradish peroxidase-*

conjugated anti-human IgA or IgG (Sigma-Aldrich)], diluido 1:2000 en PBST-L. Para la detección de bandas inmunoreactivas, se utilizó una solución comercial de los reactivos cromogénicos de la peroxidasa de rábano cloronaftol y diaminobencidina (CN/DAB Substrate Kit, Pierce). Estos ensayos fueron hechos por triplicados técnicos.

3.4. Purificación de la proteína CWH de *L. rhamnosus* GG.

Para la purificación de esta proteína se cargaron geles de poliacrilamida en los que se hicieron migrar 40 µg de fracciones de proteína extracelular de *L. rhamnosus* GG, extraídas como se describió en el apartado anterior. Tras la migración de las proteínas, se cortaron tiras de gel a la altura de la banda del marcador de 70 kDa, donde se encuentra la proteína CWH. Estas tiras se trocearon, se cargaron en una tripa de diálisis con un tamaño de poro de 8 kDa y se añadieron 3 ml de tampón de electroforesis. La tripa de diálisis se sumergió en una cubeta de electroforesis y el sistema se mantuvo durante una hora a una diferencia de potencial constante de 170 V. Siguiendo este procedimiento, se realizó una electroelución de las proteínas desde el gel al tampón. La proteína CWH, ya en solución, se concentró a 500 µl en un concentrador de vacío a temperatura ambiente (Speed-Vac, Savant), y por último se dializó frente a agua mQ durante 24 h a 4°C. Para ello se utilizó un sistema consistente en un tubo con una membrana de tamaño de poro 1 kDa (Tube-O-dialyzer, G-biosciences). La concentración de proteína se determinó mediante el test del ácido bicinonínico (BCA kit, Pierce), contrastándola con una recta patrón de seroalbúmina bovina de concentraciones conocidas.

3.5. Obtención de suero policlonal frente a la proteína CWH

El suero policlonal frente a la proteína CWH se obtuvo en el Bioterio de la Universidad de Oviedo. Se realizaron 5 inmunizaciones seriadas, dejando 15 días entre cada una de ellas, inoculando 500 µg de proteína CWH en 1 mL de PBS-Adyuvante de Freund incompleto en relación 1 a 1. Tras la última inmunización se sacrificó al conejo mediante sangrado por punción intracardíaca. La sangre obtenida se dejó coagular 4 h a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Para obtener el suero se decantaron en dos tubos de centrifuga de 50 mL, reteniendo el coágulo, y se centrifugó posteriormente 30 min 2000 g para eliminar los glóbulos rojos.

Para la purificación de la fracción de inmunoglobulinas de tipo G (IgG) se realizó una precipitación con sulfato atómico saturado al 45% (p/v) durante 1h en agitación suave y posteriormente toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 10000 g durante 1 h a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30 mL de PBS pH 8. Esto se dializó frente a 5 L de PBS pH 8.0 durante 24 h a 4°C. La fracción IgG se purificó en un sistema de cromatografía de exclusión molecular, utilizando la columna nProteinA Sepharose 4 Fast Flow (GE Lifesciences). En primer lugar, la columna se equilibró con 10 volúmenes de columna (VC) (50 mL) de PBS pH 8. En segundo lugar, se pasó el volumen de suero correspondiente, y se lavó el sistema con 6 VC de PBS pH 8. Las IgGs se eluyeron en 5 fracciones de 5 mL con ácido cítrico 100 mM pH 3, recogiénolas en tubos a los que previamente se añadía 1 mL de Tris HCl 1M pH 9 para neutralizar acidez. Las fracciones se juntaron y se centrifugarón a través de un dispositivo Vivaspin 20, con un filtro molecular de 10 kDa. El precipitado se lavó con 20 mL de PBS y la concentración de proteína se determinó a través de la Abs₂₈₀.

3.6. ELISAs frente a los extractos bacterianos y al extracto proteico del MRS.

Se realizaron ensayos ELISA del suero frente al extracto bacteriano extracelular total que se purificó de las seis cepas descritas en el primer apartado, además de frente al extracto proteico del MRS, extraído de igual manera, que fue utilizado como control negativo. Para recubrir la placa microtítulo, se utilizaron 25µl del extracto de proteínas extracelulares bacterianas (concentración 0.622 mg/ml) o del extracto proteico del MRS (concentración 0.731 mg/ml), diluidas con 75µl de PBS . La concentración de proteína se estimó midiendo la absorbancia a 280 nm en un sistema de tipo Nanodrop.

El protocolo del ensayo fue el siguiente: en una placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) se fijaron 15 µg de cada extracto, incubando 1 h a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron 2 veces con 300 µl de PBST, y se bloquearon con 200 µl de seroalbúmina bovina al 1 % (p/v) en PBS (1 h a temperatura ambiente y con una agitación suave). Los pocillos se lavaron de nuevo 2 veces con 300 µl de PBST, y se incubaron con 200 µl de distintas diluciones de los sueros en PBST durante 2 h a temperatura ambiente. Las diluciones ensayadas para cada suero fueron: 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000. Se realizaron nuevamente 2 lavados con 300 µl de PBST, y se incubaron con 100µl de anticuerpo secundario (α -IgG humana y α -IgA humana) conjugados con la peroxidasa de rábano, (Sigma-Aldrich) en PBST, diluidos 1:10000, durante una hora a temperatura ambiente. Tras 2 nuevos lavados con 300 µl de PBST, los pocillos se incubaron con 100µl del sustrato ultraTMB-ELISA, que contiene trimetilbutirina, un sustrato cromogénico de la peroxidasa de rábano. Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo 50 µl H₂SO₄ 2M. Para la titulación de los sueros, se midió la Abs₄₅₀ de los pocillos.

3.7. ELISAs para la determinación de Igs totales

Se cuantificaron las IgGs e IgAs totales del conjunto de sueros control y de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Se realizaron ELISAs directos en el que se utilizaron 200µl de distintas diluciones de suero para recubrir los pocillos, siempre diluidos en PBST. Las diluciones fueron 1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000, 1:160.000, 1:320.000, 1:640.000. Para el correcto recubrimiento de los pocillos, estas diluciones se incubaron 1h a 37°C y *overnight* a 4°C. Posteriormente se procedió al lavado de los pocillos 2 veces con 300µl de PBST, y se bloquearon con 300µl de seroalbúmina bovina al 1% en PBS (1h, RT y agitación suave). Se lavaron de nuevo, y se añadieron 100µl del anticuerpo secundario (α -IgG humana y α -IgA humana), conjugados con la peroxidasa de rábano. Se utilizó una dilución 1:5000 en PBST, y se incubó durante 1h a RT. Por último, se lavaron los pocillos y se añadieron 100µl del sustrato revelador ultraTMB-ELISA (Pierce, Rockford, IL) 20-30min RT. Las reacciones se pararon con H₂SO₄ 2M. Para la titulación de los sueros, se midió la Abs₄₅₀ de los pocillos. El título de cada suero se definió como la última dilución del suero que dio una reacción positiva.

3.8. ELISAs frente a la CWH de *L. rhamnosus* GG.

Mediante esta técnica se determinaron los títulos de IgG e IgA específicos para la proteína CWH de *L. rhamnosus* GG, tanto en los individuos sanos como en los pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal. En una placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) se fijaron 2 µg de proteína CWH en 10µl de buffer PBS, incubando primero 1 h a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron 2 veces con 300 µl de PBST, y se bloquearon con 200 µl de seroalbúmina bovina al 1 % (p/v) en PBS (1 h

a temperatura ambiente y con una agitación suave). Los pocillos se lavaron de nuevo 2 veces con 300 µl de PBST, y se incubaron con 200 µl de distintas diluciones de los sueros en PBST durante 2 h a temperatura ambiente. Las diluciones ensayadas para cada suero fueron: 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000. Se realizaron nuevamente 2 lavados con 300 µl de PBST, y se incubaron con 100µl de anticuerpo secundario (α -IgG humana y α -IgA humana), conjugados con la peroxidasa de rábano en PBST, diluidos 1:10000, durante una hora a temperatura ambiente. Tras 2 nuevos lavados con 300 µl de PBST, los pocillos se incubaron con 100µl del sustrato ultraTMB-ELISA. Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo 50 µl H₂SO₄ 2M. Para la titulación de los sueros, se midió la Abs₄₅₀ de los pocillos. El título de cada suero se definió como la última dilución del suero que dio una reacción positiva, para lo que se fijó una absorbancia de corte para cada tipo de anticuerpo (anti-IgG humana o anti-IgA humana) ensayado.

3.9. Análisis bioinformático de la CWH y síntesis de un péptido específico

La similitud de secuencia, a nivel de amino ácidos, de la CWH de *L. rhamnosus* GG (gi|258507319; ref|YP_003170070.1) fue analizada utilizando el algoritmo BlastP implementado en el National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tanto la secuencia completa como partes de su secuencia fueron enfrentadas al filo Firmicutes, comprendido en la base de datos NR. Esto nos permitió identificar un péptido específico de esta bacteria y que, con los datos disponibles a día 9 de febrero de 2012, no está presente en ninguna otra bacteria intestinal o de los alimentos. Dos miligramos de este péptido fueron sintetizados químicamente por la empresa Genecust (Luxemburgo), con una pureza mayor del 95 %.

3.10. ELISAs frente al péptido CWHp.

Se realizaron ensayos ELISA de suero para determinar el título de IgG e IgA que presentan los afectados de EII frente al péptido específico CWHp. En este caso para los ELISAS se utilizaron 5µl del péptido en concentración 2,5 mg/ml junto con 10µl de buffer PBS en cada pocillo, y se siguió el mismo protocolo de ELISA que para CWH. Se utilizaron los sueros de ocho individuos que escogimos en base al análisis estadísticos de los datos de títulos de IgG e IgA, y fueron los siguientes: C72, C65, C49, C59, P8, P39, P34 y P20.

Las diluciones ensayadas para cada suero fueron: 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000. El protocolo de actuación fue análogo al usado para CWH: el anticuerpo secundario se utilizó en dilución 1:10000, como sustrato revelador ultraTMB-ELISA, y H₂SO₄ 2M para parar la reacción. Para la titulación de los sueros, de nuevo se midió la Abs450 de los pocillos.

3.11. Métodos estadísticos

Con el fin de evaluar la distribución de los datos y ver si era posible aplicar contrastes paramétricos para detectar diferencias significativas entre los distintos grupos, se realizaron los siguientes test: test de rachas (prueba de aleatoriedad), test de Levene (prueba de homocedasticidad), test de Kolmogorov-Smirnov (prueba de normalidad) y test de Kruskal-Wallis (prueba de independencia).

Para la comparación de las medianas entre los distintos grupos (controles sanos, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Todas las pruebas se realizaron con el software SPSS v18.0.

4. ANTECEDENTES

4.1. Fraccionamiento y separación de proteínas extracelulares

En la siguiente figura, se muestran los perfiles de proteínas extracelulares de las distintas cepas utilizadas en este estudio. Como puede verse, la fracción de proteínas extracelulares presenta un perfil típico de especie.

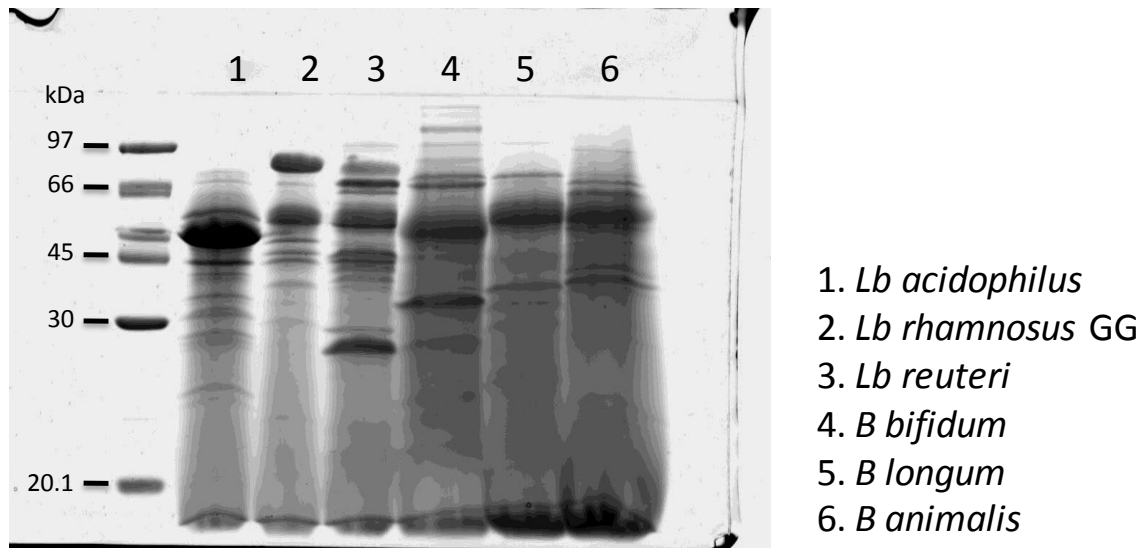


Figura 10: Perfiles de proteínas extracelulares de las bacterias utilizadas en este estudio.

Todas las bacterias de nuestro estudio son representantes de especies presentes en alimentos funcionales y de bacterias comensales de nuestro tracto intestinal. Las proteínas extracelulares tienen la particularidad de ser producidas por las bacterias y secretadas al medio externo. Nuestra hipótesis es que, cuando son secretadas dentro del tracto gastrointestinal humano, son capaces de interactuar con las células inmunes presentes en la mucosa intestinal, modulando potencialmente la respuesta inmune.

4.2. Análisis de la reactividad sérica a las proteínas extracelulares bacterianas mediante Western-Blot

Para comprobar si nuestro sistema inmune era reactivo o no frente a las proteínas extracelulares de bacterias comensales y de alimentos, inmovilizamos estas proteínas en una membrana de PVDF, tal y como se describe en Material y Métodos, y ensayamos distintos pools de sueros (n=8). Para darle más significación al estudio, y analizar una posible respuesta inmune diferencial a esta fracción proteica en el marco de una enfermedad autoinmune, analizamos cuatro grupos de sueros. Tras la unión de las inmunoglobulinas específicas de los sueros a las proteínas inmovilizadas, utilizamos dos tipos de anticuerpos policlonales secundarios, uno dirigido contra la cadena pesada de las inmunoglobulinas pesadas de tipo G (anti-IgG humana), y otro contra las de tipo A (anti-IgA humana). Por tanto, nuestro análisis permitía la interacción a dos tipos de niveles dentro del sistema inmune humano: innato (IgA) y adaptativo (IgG).

Como puede verse en la figura 11 analizamos, por un lado, un grupo control de sueros obtenidos de individuos sanos, sin patología conocida. Por otro, tres grupos de pacientes con distintas manifestaciones de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII): enfermedad de Crohn con mutaciones en el gen *nod2*, enfermedad de Crohn sin mutaciones en el gen *nod2* y colitis ulcerosa. A raíz de los resultados obtenidos, se observa la presencia de mas bandas inmunoreactivas en sueros de individuos con EII que en controles. Además, se evidenció una banda inmunoreactiva (Imp35), identificada como una hidrolasa de pared celular (CWH) por espectrometría de masas, que aparecía en todos los grupos y que, además presentaba distinta intensidad de señal (y por tanto de reacción), cuando se valoraba la presencia de IgAs reactivas en el suero.

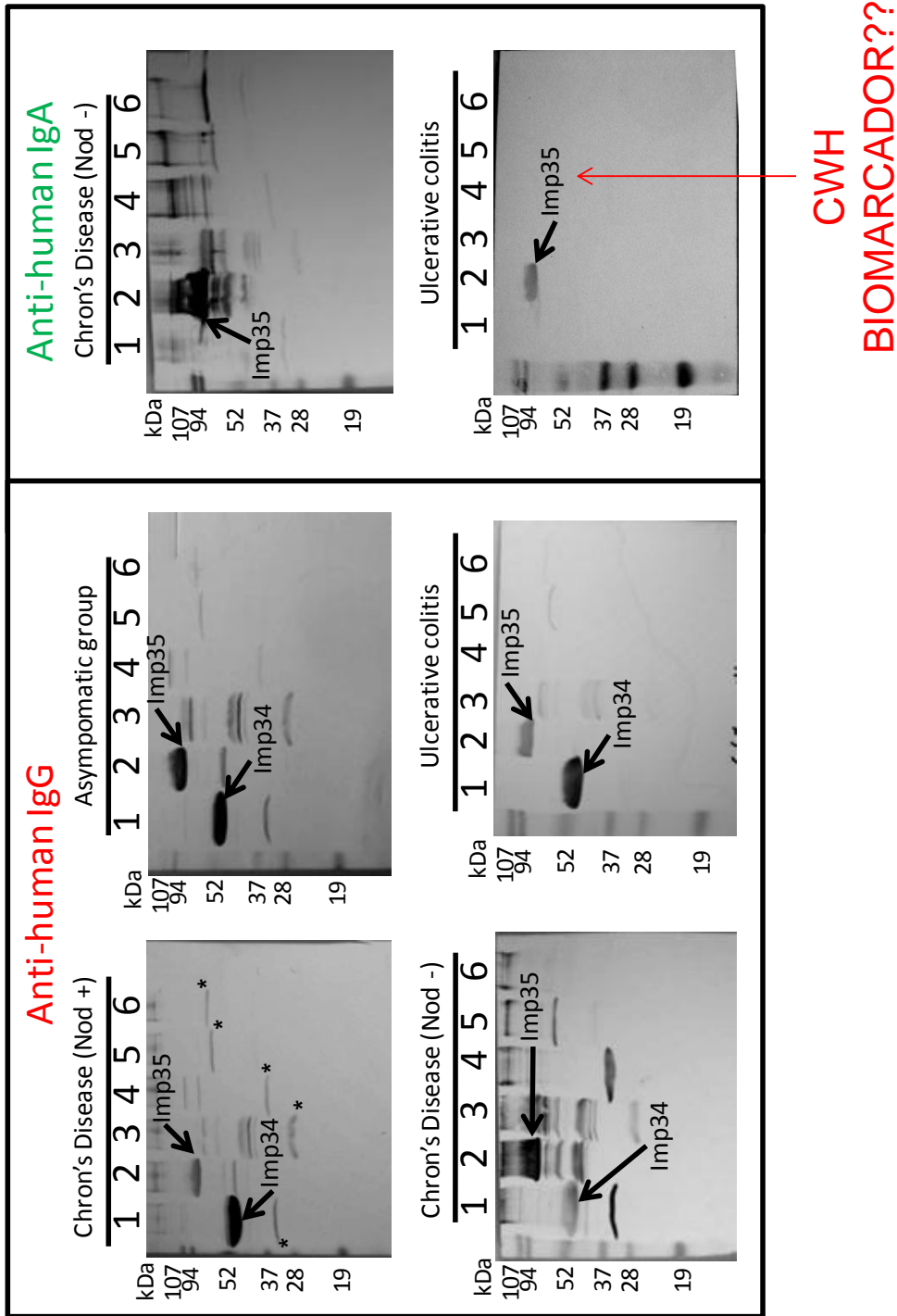


Figura 11: análisis mediante Wester blot de la inmunreactividad sérica a proteínas extracelulares bacterianas de los sueros de individuos según los tres grupos de este estudio: Control, EC y CU

4.3. Objetivos

Esta pista fue aún más evidente tras el análisis más exhaustivo de los 110 sueros por separado mediante la técnica Western Blot. Este análisis reveló la existencia de distintos perfiles de inmunoreactividad proteica a las proteínas extracelulares bacterianas, siendo la proteína CWH reactiva para IgA en la mayor parte de los casos, como puede verse en la siguiente figura:

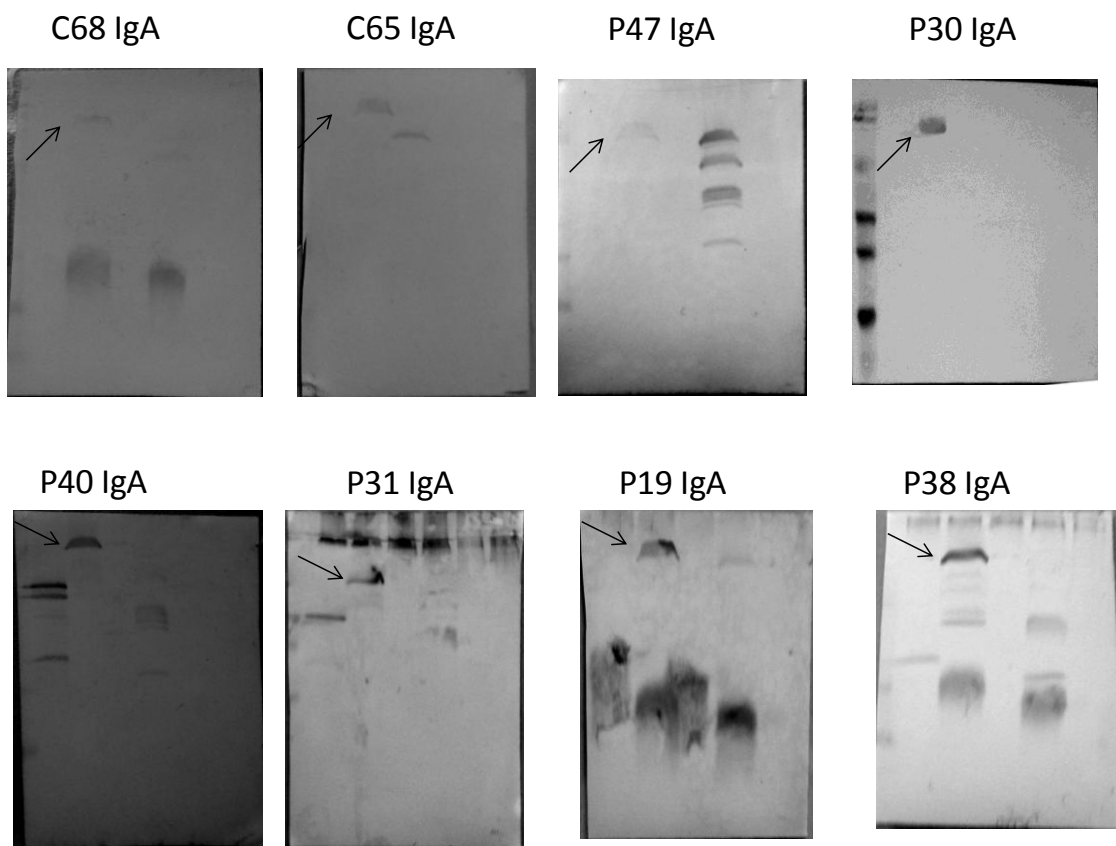


Figura 12: distintos perfiles de inmunoreacción a las proteínas extracelulares, correspondientes a los sueros de distintos individuos control (C) o pacientes (P). En todos los casos se valoró la presencia de IgAs específicas. La banda inmunoreactiva correspondiente a la CWH de *Lb. rhamnosus* GG, se indica con flechas negras.

Con estos antecedentes, el objetivo fue titular los sueros de todos los sueros (controles sanos y pacientes de EII) frente a la proteína CWH de *Lb. rhamnosus* GG, tanto para conocer los niveles de IgG como de IgA, y estudiar sus niveles diferenciales en estos grupos de individuos. También pretendimos conocer la especificidad de esta inmunoreacción mediante la síntesis de un péptido específico de esta proteína, únicamente presente en *Lb. rhamnosus*.

Con todos estos datos, este trabajo busca proponer los niveles de anticuerpos dirigidos contra la proteína CWH de *Lb. rhamnosus*, como biomarcadores de EII.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION

5.1. ELISAs frente a extracto bacteriano y de MRS.

Antes de estudiar posibles cambios en los títulos de los sueros, tanto de controles sanos como de pacientes de EII, frente a la proteína CWH de *Lb. rhamnosus*, se determinó la respuesta inmune global analizando la presencia de IgGs y de IgAs específicas a la fracción de proteínas extracelulares de las bacterias incluidas en este estudio, y también específicas a las proteínas del MRSC, que co-precipitan con las anteriores. Los ensayos se realizaron por triplicado, y se fijó una absorbancia (a 450 nm) de corte de 0,35 para determinar los títulos de anticuerpos. Es decir, se tomó como positiva toda aquella reacción donde la absorbancia a 450 nm fuese mayor o igual a 0,35.

Tomando como medida de tendencia central la mediana de los triplicados, se observó que tanto en los casos donde se ensayó la presencia de IgGs específicas como para las IgAs, los títulos fueron más altos frente a las proteínas presentes en el extracto bacteriano que frente a las proteínas extraídas del MRSC (Tabla 1).

Suero num	Recubrimiento	cut-off=0.35			Ac 2º	MEDIANA
		Titulo I	Titulo II	Titulo III		
Control	Extracto bacteriano	100	0	0	IgG	0
		500	500	250	IgA	500
EII		100	100	250	IgG	100
		500	500	500	IgA	500
Control	MRS	100	0	0	IgG	0
		100	250	500	IgA	
EII		0	100	0	IgG	0
		250	500	250	IgA	250

Tabla 1: resultados de los títulos de anticuerpos IgG e IgA frente a extracto bacteriano y frente a extracto de MRS de los sueros según su condición de enfermedad. Se representan las 3 réplicas del ensayo y la mediana.

Es decir, el número de IgGs e IgAs frente al extracto de proteínas extracelulares bacterianas fue mayor que frente a las proteínas del MRSC. Estas proteínas provienen de sus principales componentes, que son la proteosa peptona, el extracto de carne y el extracto de levadura. De hecho, la proteína precipitada mayoritariamente del MRSC es la serpina de cerdo (Urdaci y Sánchez, 2008). Por tanto, parte de la reactividad de los sueros observada en los ELISAs se debían a una respuesta frente a las proteínas del MRSC, que bien pueden ser asimiladas a proteínas de la dieta. De forma habitual, estas proteínas están presentes en los alimentos, y en una situación normal existe un contacto con las células inmunes del TGI que implica la generación de anticuerpos (principalmente IgAs) contra ellos por parte del individuo (Suzuki y cols, 2007).

En cambio, la respuesta observada con el extracto de proteínas extracelulares fue mayor, indicando que existe una respuesta inmune a las proteínas secretadas por las bacterias de los alimentos y comensales. Además se puede observar que los títulos son más altos para IgA que para IgG, y no se observan diferencias entre los pool de sueros control y sueros de enfermos. Esto está de acuerdo con los datos de la literatura, que describen que la respuesta mayoritaria a la microbiota comensal del tracto gastrointestinal y de alimentos es en forma de anticuerpos tipo IgA (Suzuki y cols, 2007).

5.2. ELISAs para la determinación de Igs totales

Antes de realizar la titulación de los anticuerpos específicos contra la CWH de *Lb. rhamnosus*, nos preguntamos si los niveles de IgAs e IgGs en los sueros a ensayar eran distintos. Este era un análisis previo muy importante, ya que diferencias en las titulaciones entre los distintos grupos podrían deberse a una alteración (mayor o menor) en la producción de las inmunoglobulinas correspondientes. Realizamos el ensayo por

duplicado, no observando diferencias ni en el nivel de IgGs totales ni en el de IgAs totales entre controles sanos y pacientes de EII. Esto también está de acuerdo con datos obtenidos de la literatura científica (Manukyan y cols., 2008).

Más concretamente, y estableciendo un valor de absorbancia (a 450nm) de 0,30, la mediana fue de 1:5000 para IgG y de 1:10000 para IgA, y para ambos grupos (Tabla 2).

NUMERO	DILUCION											Ac 2º	TITULO
	BLANCO	1:1000	1:2500	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000		
CONTROLES	0.129	0.664	0.383	0.395	0.202	0.178	0.17	0.156	0.15	0.151	0.209	IgG	1:5000
	0.129	0.854	0.373	0.442	0.205	0.184	0.182	0.182	0.151	0.15	0.194	IgG	
	0.132	1.266	0.676	0.542	0.422	0.288	0.236	0.171	0.161	0.191	0.187	IgA	1:10000
	0.133	1.259	0.675	0.459	0.303	0.253	0.199	0.213	0.172	0.17	0.21	IgA	
EII	0.205	0.755	0.393	0.574	0.258	0.206	0.165	0.161	0.173	0.195	0.155	IgG	1:5000
	0.131	0.736	0.379	0.627	0.24	0.183	0.167	0.156	0.188	0.203	0.156	IgG	
	0.138	1.256	0.563	0.547	0.408	0.27	0.21	0.199	0.205	0.243	0.226	IgA	1:10000
	0.173	1.202	0.574	0.513	0.331	0.263	0.201	0.184	0.19	0.207	0.279	IgA	

Tabla 2: título de IgG e IgA totales de los sueros de los dos grupos objeto de estudio: control y EII. Se muestra la dilución de los conjuntos de suero que se empleó y la absorbancia que resultó del ELISA para cada anticuerpo.

5.3. Purificación de la proteína CWH de *Lb. rhamnosus* GG.

Para la purificación de la proteína CWH de *Lb. rhamnosus* GG, se cargaron 40 µg de extracto extracelular por calle, sumando un total de 14 calles más el marcador de masa molecular preteñido. El gel de poliacrilamida se cortó a la altura correspondiente del marcador de masa molecular de 70 kDa, en cubos de más o menos 1mm³. Estos cubos se metieron en tripa de diálisis, tal y como está descrito en la sección de material y métodos, y se aplicó un campo eléctrico que, por un lado, liberó la proteína de la matriz de poliacrilamida y, por otro, la membrana de diálisis contuvo la proteína dentro de ella. Este proceso se encuentra esquematizado en la figura 13. Como resultado de este

proceso, y previa dialización extensiva de las muestras frente a PBS, se obtuvo suficiente proteína pura como para poder realizar la detección, por ELISA, de anticuerpos IgG e IgA específicos en una colección de sueros de controles sanos y pacientes de EII.

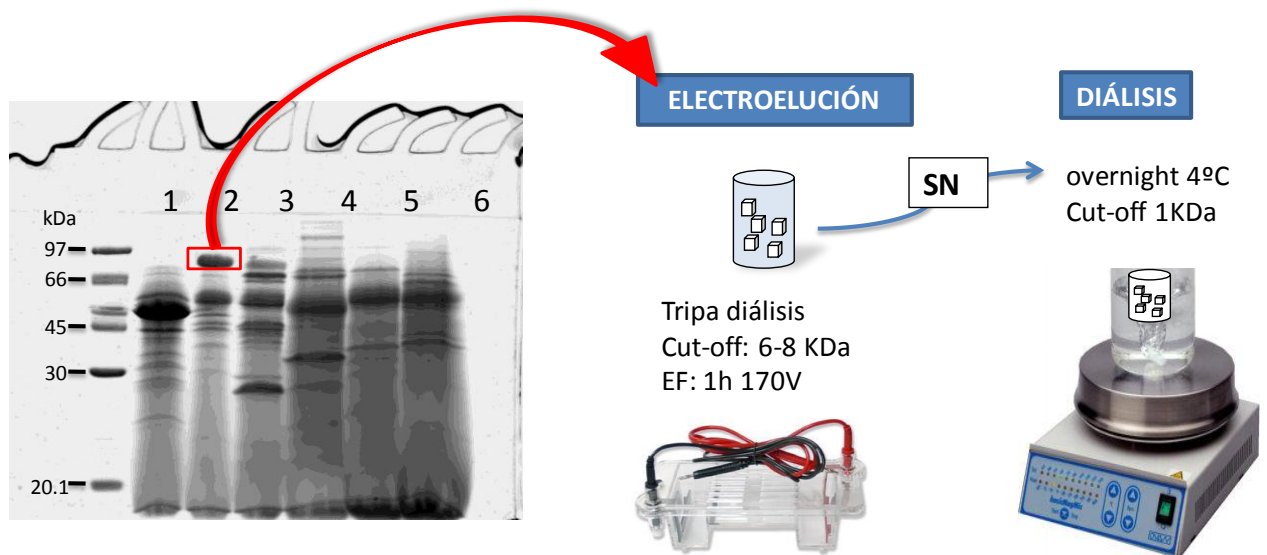


Figura 13: perfiles de proteínas extracelulares de LGG, y esquema de la electroelución y purificación de CWH de *Lb. rhamnosus* GG.

5.4. ELISAs frente a la CWH de *L. rhamnosus* GG.

Realizamos la titulación de cada uno de los sueros frente a la proteína CWH de *Lb. rhamnosus* GG, tal y como se indica en Material y Métodos. Para definir los títulos de los sueros, consideramos una reacción positiva cuando la absorbancia fue mayor o igual a 0,35, tanto en el caso de la detección de IgGs específicas como de IgAs. Los títulos obtenidos, considerando un grupo de controles sanos y dos grupos de EII (EC y CU) fueron las siguientes:

SUERO NUM	CONDICION	Título IgG	Título IgA
C45	CONTROL	1000	1000
C40	CONTROL	1000	2500
C14	CONTROL	500	100
C18	CONTROL	0	2500
C36	CONTROL	500	2500
C37	CONTROL	100	1000
C46	CONTROL	0	250
C48	CONTROL	100	500
C49	CONTROL	250	1000
C6	CONTROL	250	1000
C50	CONTROL	0	1000
C51	CONTROL	100	100
C52	CONTROL	2500	2500
C54	CONTROL	250	500
C55	CONTROL	500	2500
C56	CONTROL	100	5000
C57	CONTROL	500	1000
C58	CONTROL	0	2500
C59	CONTROL	250	1000
C61	CONTROL	500	2500
C62	CONTROL	500	2500
C63	CONTROL	1000	5000
C64	CONTROL	500	2500
C65	CONTROL	500	10000
C66	CONTROL	500	2500
C67	CONTROL	2500	2500
C68	CONTROL	2500	10000
C35	CONTROL	250	2500
C38	CONTROL	100	1000
C39	CONTROL	500	2500
C41	CONTROL	2500	2500
C42	CONTROL	500	1000
C43	CONTROL	500	500
C44	CONTROL	250	2500
C47	CONTROL	500	1000
C53	CONTROL	500	1000
C60	CONTROL	100	1000
C69	CONTROL	100	1000
C70	CONTROL	500	2500
C71	CONTROL	500	5000
C72	CONTROL	2500	2500
C73	CONTROL	1000	2500
C74	CONTROL	250	2500
C75	CONTROL	0	1000

C76	CONTROL	0	500
C77	CONTROL	100	1000
C78	CONTROL	0	1000
C79	CONTROL	0	2500
C80	CONTROL	250	500
C81	CONTROL	100	5000
P3	E.CROHN	500	5000
P13	E.CROHN	500	500
P18	E.CROHN	0	1000
P30	E.CROHN	500	10000
P32	E.CROHN	250	10000
P39	E.CROHN	500	2500
P50	E.CROHN	100	1000
P4	E.CROHN	250	5000
P12	E.CROHN	100	5000
P14	E.CROHN	500	10000
P19	E.CROHN	500	5000
P31	E.CROHN	1000	5000
P35	E.CROHN	1000	2500
P36	E.CROHN	250	2500
P38	E.CROHN	2500	10000
P40	E.CROHN	500	10000
P42	E.CROHN	0	2500
P43	E.CROHN	500	2500
P44	E.CROHN	500	1000
P47	E.CROHN	1000	1000
P48	E.CROHN	0	500
P52	E.CROHN	0	1000
P9	E.CROHN	0	1000
P10	E.CROHN	1000	2500
P26	E.CROHN	500	2500
P27	E.CROHN	250	2500
P34	E.CROHN	2500	2500
P2	E.CROHN	1000	2500
P15	E.CROHN	500	500
P16	E.CROHN	0	500
P17	E.CROHN	100	1000
P24	E.CROHN	250	5000
P25	E.CROHN	500	2500
P37	E.CROHN	1000	2500
P49	E.CROHN	100	500
P51	E.CROHN	0	1000
P1	COL.ULCEROSA	250	5000
P5	COL.ULCEROSA	0	2500
P6	COL.ULCEROSA	1000	5000

P7	COL.ULCEROSA	500	1000
P8	COL.ULCEROSA	500	2500
P11	COL.ULCEROSA	1000	2500
P20	COL.ULCEROSA	500	10000
P21	COL.ULCEROSA	500	5000
P22	COL.ULCEROSA	1000	1000
P23	COL.ULCEROSA	500	2500
P28	COL.ULCEROSA	0	2500
P29	COL.ULCEROSA	1000	2500
P33	COL.ULCEROSA	500	5000
P46	COL.ULCEROSA	0	500
P53	COL.ULCEROSA	0	1000

Tabla 3: valores de los títulos de todos los individuos analizados por ELISA, distribuidos pr su condición de enfermedad.

Respecto a la distribución de los valores, se comprobó que la distribución de los datos no era normal (Tabla 3, Figura 14).

La mediana de títulos se situó, para controles, en 1:250 (IgG) y 1:1000 (IgA). Para EII las medianas fueron 1:500 (IgG) y 1:2500 (IgA). Un análisis estadístico más exhaustivo mediante el test de Kruskal-Wallis desveló que para los títulos de IgG no existían diferencias significativas ($p < 0,655$), pero sí para los de IgA entre controles y EII con un nivel de significación de 0,034. Si los valores *outlayer* eran excluidos del análisis, la significación de los títulos de IgG mejoró pero siguió sin ser diferente estadísticamente ($p < 0,179$). En cambio la significación para los títulos de IgA sí mejoró bastante ($p < 0,002$). Como puede observarse en la Figura 14, 6 de los 55 controles sanos fueron identificados como *outlayers*, el C56, C63, C65, C68, C71 y C81.

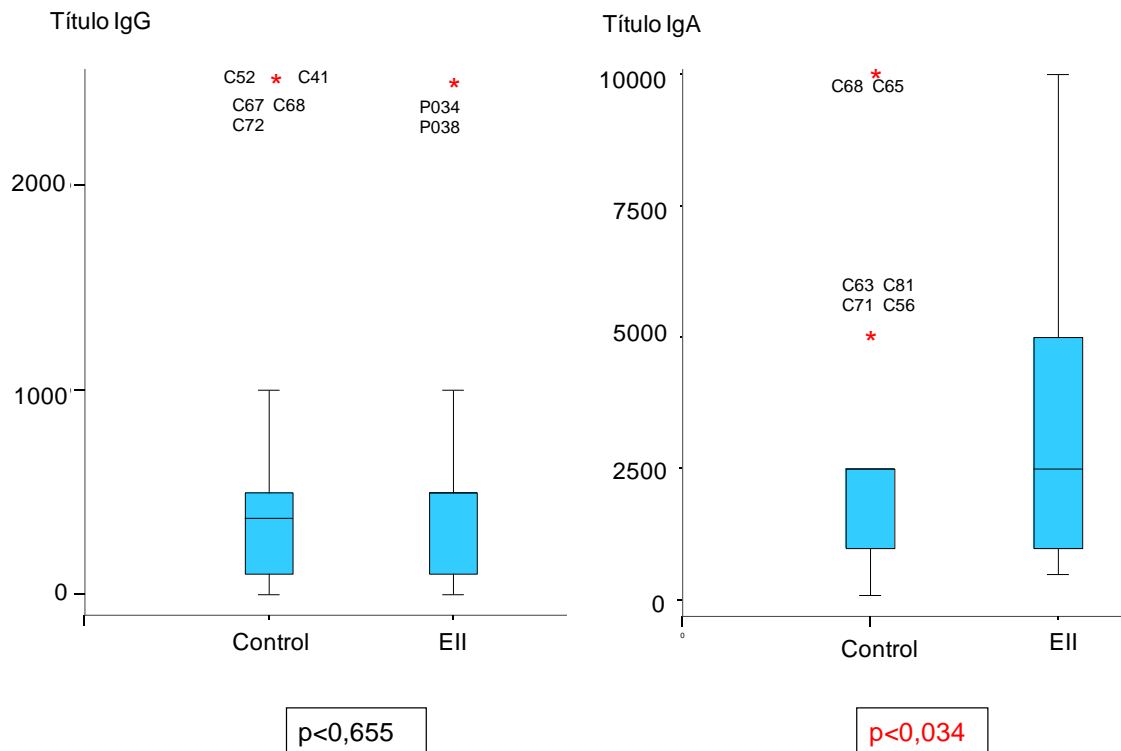


Figura 14: títulos determinados para IgG e IgA en distribución de dos grupos: control y enfermedad inflamatoria intestinal. Se indican con asterisco los individuos con valores atípicos y en recuadro los niveles de significación.

Si por otro lado estudiamos los resultados dividiendo a los individuos en tres grupos (Figura 15), control, EC y CU, y excluyendo los valores de títulos *outlayer*, no aparecen diferencias significativas en los títulos de IgG, pero sí en los de IgA cuando se compara la población de EC ($p < 0,010$) o de CU ($p < 0,002$) con respecto a los controles sanos.

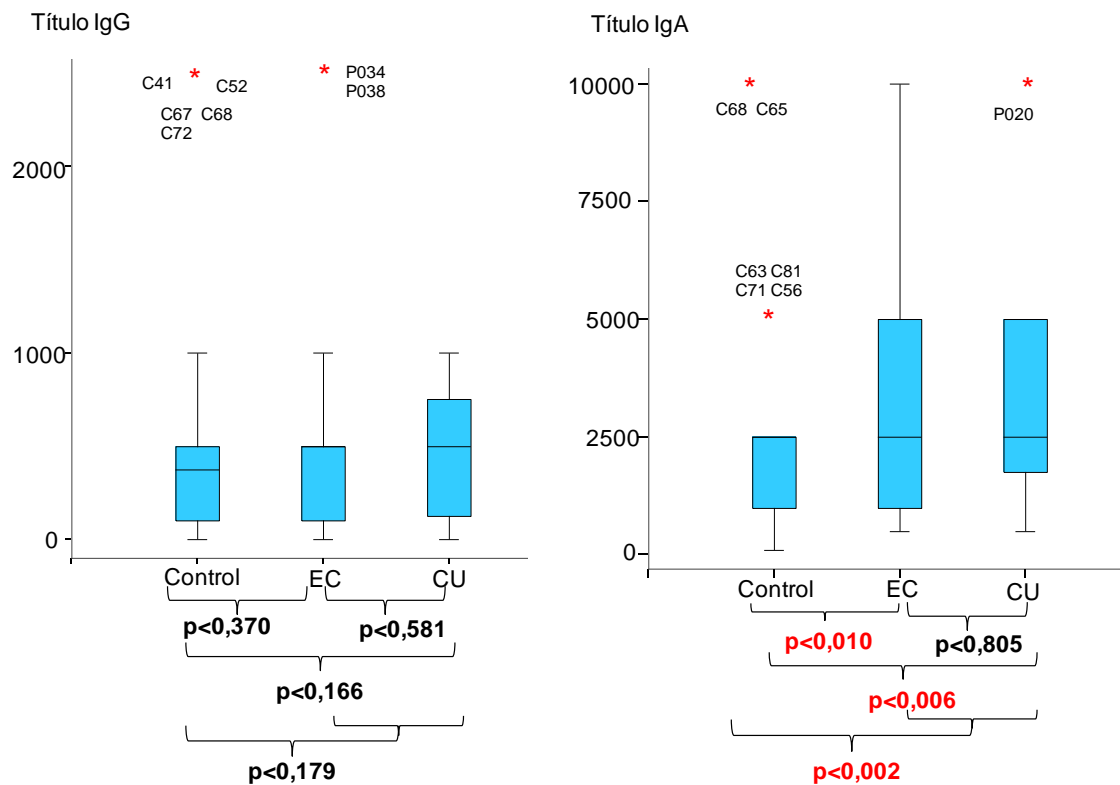


Figura 15: títulos de IgG e IgA en distribución de tres grupos de individuos: control, EC y CU.

Podemos afirmar, por tanto, que es posible discriminar entre una población de controles sanos y una de pacientes con EII, bien divididos en EC y UC o no, a través de sus títulos de IgAs específicas contra la CWH de *Lb. rhamnosus* GG.

En otros estudios anteriores de enfermedades autoinmunes que cursan con inflamación también se estudiaron los niveles de anticuerpos contra antígenos de bacterias comensales. Manukyan y cols. estudiaron la fiebre mediterránea familiar y vieron: que no encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos totales en suero con respecto a controles sanos; que los títulos de IgG fueron más altos frente a antígenos de todos los géneros menos *Lactobacillus*, en pacientes que en controles con y que solo encontraron títulos más altos de IgA dirigidos contra *Parabacteroides*, pero

no contra *Bacteroides*, ni *Lactobacillus*, ni *Escherichia* ni *Enterococcus*. Para el estudio realizaron análisis ELISA de los sueros de los individuos frente a lisado bacteriano aislado de TGI.

En otro estudio, y en contraste a nuestros resultados, se analizaron anticuerpos sistémicos contra bacterias de la mucosa (aislaron 24 especies de 11 géneros distintos de biopsias de colon) en casos de UC y EC (Furrie y cols., 2004); estos investigadores hallaron niveles más altos de IgG contra cepas de *Peptostreptococcus*, *Enterobacteria faecalis*, tres cepas de *Clostridium* y *Streptococcus bovis*, en pacientes de UC, pero niveles más altos en IgGs de controles sanos para antígenos de *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bifidobacteria* y *Bacteroides*. En cuanto a niveles de IgA, de las 12 bacterias que escogieron, 7 presentaban niveles más altos de IgA en el grupo control, dos eran más altos en CD y tres en UC. De las ocho bacterias que presentaban niveles mayores en IgG en el grupo de CU, solo *Peptostreptococcus anaerobius* mostró niveles altos de IgA. Tampoco hallaron diferencias significativas en las concentraciones totales en suero de inmunoglobulinas entre los tres grupos mediante test de inmunodifusión radial. Concluyen que el hecho de que solo la respuesta de IgG se viese afectada no les fue sorprendente ya que es el anticuerpo que principalmente aumenta en UC.

En un tercer estudio encontrado en la bibliografía, mucho más amplio en tamaño muestral (252 pacientes con EC, 53 con UC y 43 controles) realizado por Schoepfer y cols. en 2010, analizaron la asociación del fenotipo Crohn a anticuerpos contra diferentes antígenos microbianos: flagelina A2 y flagelina X de *Clostridium*, carbohidratos de los mananos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* o ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies), y a autoantígenos: anticuerpos contra citoplasma de neutrófilos o p-ANCA, anticuerpos contra el páncreas exocrino o

PAB y mutaciones en el gen *nod2*. Encontraron que los niveles de IgG eran más altos que los de IgA en todos los grupos y para todos los antígenos bacterianos, y que los pacientes de EC con un número incrementado de anticuerpos contra antígenos microbianos sufren más a menudo complicaciones en la enfermedad e incluso llegan a necesitar cirugía. También llegan a demostrar que existe una asociación entre una tasa de mutación mayor en el gen *nod2* y títulos más altos de anticuerpos antimicrobianos, en concreto de ASCA.

5.6. Análisis bioinformático de la CWH y síntesis de un péptido específico

Una vez obtenidos y analizados los resultados de títulos para la CWH de *Lb. rhamnosus* GG, se planteó la cuestión de si esta respuesta era debida exclusivamente a anticuerpos dirigidos específicamente contra la proteína o, en cambio, podían ser anticuerpos dirigidos contra proteínas homólogas de otras bacterias comensales o patógenas.

Un análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica contra la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), reveló la existencia de proteínas homólogas en la inmensa mayoría de géneros del Filo Firmicutes (Figura 16), un filo bacteriano que se caracteriza por tener bajo contenido de Guanina+Citosina en su genoma y una pared celular, que les hace reaccionar positivamente a la tinción de Gram. Más concretamente, la zona homóloga es un dominio responsable de la unión de cierto tipo de proteínas de superficie a la pared celular de bacterias Gram positivas (NLPC_P60), presente en proteínas de invasión utilizadas por patógenos (Xu y cols., 2011).

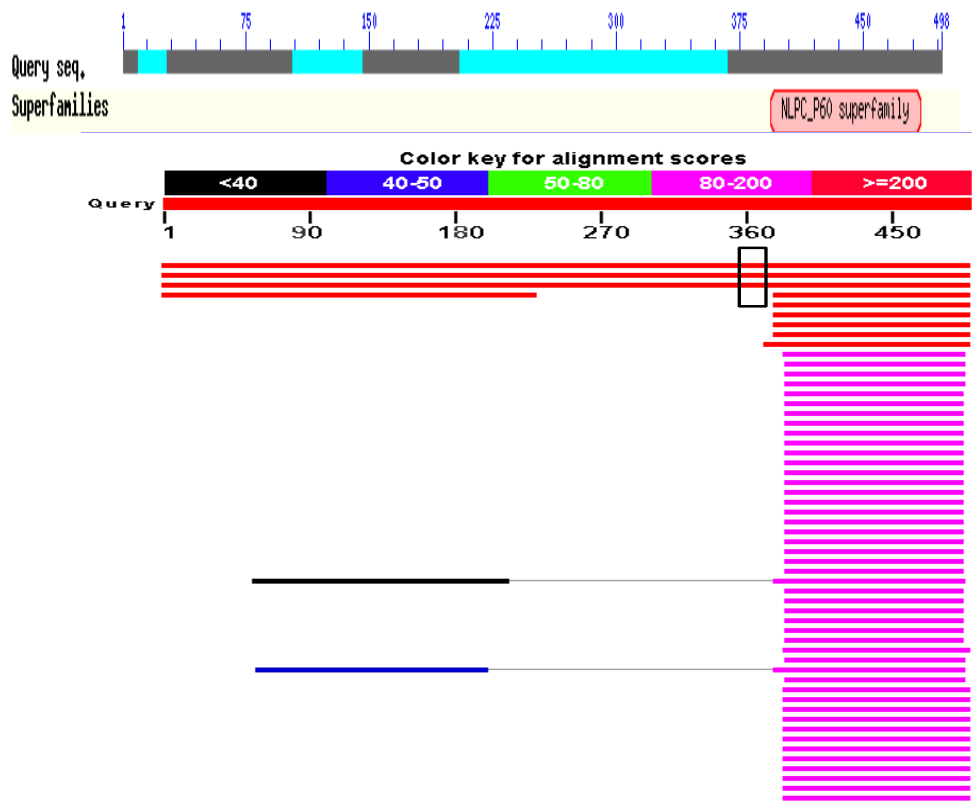


Figura 16: resultado del alineamiento de secuencia realizado para la proteína CWH (p75 o Msp2) de *Lb. rhamnosus* GG frente al filo Firmicutes. Se recuadra en negro la zona de menor homología con el resto de especies, donde se escogió una región de 13 aminoácidos para el diseño del péptido CWHp.

Este análisis nos permitió identificar un péptido de 13 amino ácidos, situado en uno de los bordes de la secuencia de la proteína específica para lactobacilos, y que mediante análisis BLAST se comprobó que sólo estaba presente en la especie *Lb. rhamnosus*.

5.7 .ELISAs frente al péptido CWHp.

Tras unir el péptido de la CWH específico para *Lb. rhamnosus* (CWHp) a las placas microtítulo, determinamos el título mediante ELISA de 8 sueros, controles sanos y pacientes, que abarcaron todo el ámbito de la distribución de datos (Tabla 4).. Los ensayos se hicieron por triplicado y estableciendo un corte de absorbancia a 450 nm de

0,35 (tabla 4). Es decir, se consideró positiva toda reacción donde la absorbancia era mayor o igual a 0,35.

SUERO NUMERO	Titulo IgG (Titulo vs CWH)	Titulo IgA (Título vs CWH)
C72	0 (2500)	250 (2500)
C65	0 (500)	500 (1000)
P34	0 (2500)	250 (2500)
P20	0 (500)	1000 (10.000)
C49	0 (250)	500 (1000)
C59	0 (250)	500 (1000)
P39	0 (500)	500 (2500)
P8	0 (500)	1000 (2500)

Tabla 4: títulos de IgG e IgA de ocho individuos frente al péptido CWHp. Se muestra el título correspondiente que presentó frente a la proteína completa CWH..

En comparación con los resultados de los títulos frente a la CWH, nuestros datos indican que la respuesta a esta proteína extracelular en forma de anticuerpos IgA es específica a *Lb. rhamnosus*, mientras que no hay apenas respuesta en forma de IgG. Esto indica que probablemente estemos detectando anticuerpos cruzados frente al dominio NLPC_P60, también presente en proteínas de invasión secretadas por patógenos.

6. CONCLUSIONES

- Existe una respuesta inmune frente a las proteínas extracelulares de bacterias de la microbiota intestinal en forma de anticuerpos IgG e IgA.
- Es posible discriminar entre una población de controles sanos y una de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, bien divididos o no en enfermos de Crohn y colitis ulcerosa, a través de sus títulos de IgAs específicas contra la proteína hidrolasa de pared celular de *Lb. rhamnosus* GG o proteína CWH.
- La proteína CWH presenta un dominio específico de hidrolasas de pared de lactobacilos y otro común a diversos tipos de familias de proteínas de bacterias Gram positivas, denominada NLPC_P60, entre las cuales podemos encontrar representantes de bacterias patógenas.
- Mediante el uso de un péptido específico de la proteína CWH de *Lb. rhamnosus*, se demostró que la respuesta IgA parece ser específica a esta especie, mientras que la respuesta IgG parece estar dirigida contra la zona común de la proteína, presente en una gran variedad de microorganismos patógenos.
- Los títulos de IgA frente al péptido específico de la proteína CWH de *Lb. rhamnosus*, junto con otros péptidos específicos de otras bacterias de alimentos, tienen potencial de ser utilizados en un futuro en un panel de pruebas bioquímicas para la detección precoz de EII.

BIBLIOGRAFIA

Adams RJ, Heazlewood SP, Gilshenan KS, O'Brien M, McGuckin MA, Florin TH. (2008). IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's disease than IgG against mannan or flagellin. *Am J Gastroenterol.* 103:386-96.

Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E. & Stanton, C. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. FAO/WHO report. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

Claes IJ, Schoofs G, Regulski K, Courtin P, Chapot-Chartier MP, Rolain T, Hols P, von Ossowski I, Reunanen J, de Vos WM, Palva A, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC, Lebeer S. (2012) Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS One.* 7:e31588.

Davis MK, Andres JM, Jolley CD, Novak DA, Haafiz AB, González-Peralta RP. (2007). Antibodies to *Escherichia coli* outer membrane porin C in the absence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are an unreliable marker of Crohn disease and ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 45:409–413

Furrie E, Macfarlane S, Cummings JH, Macfarlane GT. (2004). Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut.* 53:91-8.

Jansson J, Willing B, Lucio M, Fekete A, Dicksved J, Halfvarson J, Tysk C, Schmitt-Kopplin P. (2009). Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *PLoS One*. 4:e6386.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 8, 171–184.

Manukyan GP, Ghazaryan KA, Ktsoyan ZA, Khachatryan ZA, Arakelova KA, Kelly D, Grant G, Aminov RI. (2008). Elevated systemic antibodies towards commensal gut microbiota in autoinflammatory condition. *PLoS One*. 3:e3172.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464:59-65.

Salminen, S. J., Gueimonde, M. & Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *J Nutr* 135, 1294–1298.

Sánchez B, Chaignepain S, Schmitter JM, Urdaci MC. (2009). A method for the identification of proteins secreted by lactic acid bacteria grown in complex media. *FEMS Microbiol Lett.* 295:226-9.

Sánchez B, Urdaci MC, Margolles A. (2010). Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology.* 156:3232-42.

Sartor RB. (2008). Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:16413-4.

Schoepfer AM, Flogerzi B, Seibold-Schmid B, Schaffer T, Kun JF, Pittet V, Mueller S, Seibold F. (2009). Low Mannan-binding lectin serum levels are associated with complicated Crohn's disease and reactivity to oligomannan (ASCA). *Am J Gastroenterol.* 104:2508-16.

Schoepfer AM, Schaffer T, Mueller S, Flogerzi B, Vassella E, Seibold-Schmid B, Seibold F. (2009). Phenotypic associations of Crohn's disease with antibodies to flagellins A4-Fla2 and Fla-X, ASCA, p-ANCA, PAB, and NOD2 mutations in a Swiss Cohort. *Inflamm Bowel Dis.* 15:1358-67.

Schoepfer AM, Schaffer T, Mueller S, Flogerzi B, Vassella E, Seibold-Schmid B, Seibold F. (2009). Phenotypic associations of Crohn's disease with antibodies to flagellins A4-Fla2 and Fla-X, ASCA, p-ANCA, PAB, and NOD2 mutations in a Swiss Cohort. *Inflamm Bowel Dis.* 15:1358-67.

Seth A, Yan F, Polk DB, Rao RK. (2008). Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294:G1060-9.

Suzuki K, Ha SA, Tsuji M, Fagarasan S. (2007). Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol.*19:127-35.

Urdaci MC, Sánchez B. (2008). Some immunomodulatory effects of probiotic bacteria might be due to porcine neutrophil elastase inhibitor, a serpin present in MRS broth. *Immunol. Lett.* 122:99-100.

Van Den Bogaerde J, Cahill J, Emmanuel AV, Vaizey CJ, Talbot IC, Knight SC, Kamm MA. (2002). Gut mucosal response to food antigens in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 16:1903-15.

Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev.* 32:259-86.

Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. (2009) Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.*15:653-60.

Xu Q, Rawlings ND, Chiu HJ, Jaroszewski L, Klock HE, Knuth MW, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA.(2011). Structural analysis of papain-like NlpC/P60 superfamily enzymes with a circularly permuted topology reveals potential lipid binding sites. *PLoS One.*;6:e22013.

Yan F, Cao H, Cover TL, Washington MK, Shi Y, et al. (2011). Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J Clin Invest* 121:2242–2253.

Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. (2007). Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 132:562-75.