

## Capítulo 25

### Diseño científico de un producto lácteo para celíacos

Daniel Ramón

Biopolis SL; Parc Científic Universitat de València; C/ Agustín Escardino Benlloch 9; 46980-Paterna; Valencia, España.

[daniel.ramon@biopolis.es](mailto:daniel.ramon@biopolis.es)

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.170>

#### Referenciar este capítulo

Ramón, D. *Diseño científico de un producto lácteo para celíacos*. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p. 497-506.

## **Resumen**

Los enfermos celíacos deben seguir de forma estricta una dieta libre de gluten. La base tecnológica de esta oferta se centra exclusivamente en la generación de productos libres de dicha proteína o sus trazas, sin aportar ningún otro beneficio. Muy recientemente se ha desarrollado un suplemento lácteo denominado Proceliac que pretende cambiar esta tendencia en el diseño de productos para celíacos. La base de este producto es un probiótico denominado ES1 que tiene un fuerte efecto antiinflamatorio demostrado tanto en experimentos con células humanas en cultivo como en animales de experimentación. Se ha evaluado la seguridad alimentaria de la bacteria ES1 siguiendo las reglas de la Organización Mundial de la Salud. Además se ha secuenciado su genoma para asegurar la ausencia de genes que codifiquen proteínas conflictivas. Finalmente se han llevado a cabo dos ensayos clínicos con adultos sanos y con niños celíacos al comienzo de dieta libre de gluten con excelentes resultados que han revelado la capacidad de esta cepa probiótica para rebalancear la microbiota del tracto digestivo de los enfermos celíacos.

## **Abstract**

After receiving a celiac disease diagnosis, patients need to be on a gluten-free diet. The technological bases of the gluten-free products are focused on generating free products of gliadins, without providing any other nutritional benefit. Very recently we have developed a milk supplement called Proceliac that aims to change this trend in the design of products for celiac patients. The basis of this product is a probiotic called ES1 that has shown strong anti-inflammatory effect in both experiments with human cell cultures and in preclinical animal experimentation. The food safety of the ES1 probiotic has been evaluated following the guidelines of World Health Organization. Moreover, its genome has been fully sequenced to ensure the absence of conflictive genes. Finally, two clinical trials on healthy adults and children with celiac disease at the beginning of gluten-free diet have been performed with excellent results that indicate the ability of this strain to equilibrate the gut microbiota of celiac patients.

## 1. Introducción

### 1.1. La enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca (abreviadamente EC) es una patología autoinmune que se produce cuando individuos genéticamente predispuestos ingieren péptidos provenientes de las  $\alpha$ -gliadinas del trigo o de otros cereales.<sup>1,2</sup> Sus manifestaciones clínicas incluyen síntomas de inflamación intestinal y malabsorción de nutrientes, junto con daño severo en la mucosa.<sup>3</sup> Esta inflamación se produce porque tras la ingesta, las  $\alpha$ -gliadinas son degradadas parcialmente por las proteasas digestivas rindiendo oligopéptidos que son resistentes a la proteólisis debido a su alto contenido en glutamina y prolina.<sup>4,5</sup> Estos péptidos disparan la respuesta inmune inflamatoria dando lugar a los síntomas de la enfermedad.<sup>6-11</sup> Ligado a estos efectos inflamatorios hay que destacar que los individuos celíacos sufren cambios importantes en su microbiota intestinal, ya que en la misma hay una mayor presencia de cepas pertenecientes al género *Bacteroides* y *Clostridium* y una menor proporción de bifidobacterias.<sup>12-17</sup>

La incidencia de la EC se cifra en un 1% de la población, aunque se estima que por cada caso diagnosticado hay entre 7 y 11 casos no diagnosticados.<sup>18</sup> No existe un tratamiento terapéutico para la enfermedad celíaca. Por ello, el individuo celíaco debe seguir una dieta libre de gluten durante toda su vida.<sup>19</sup> El mercado mundial de la alimentación libre de gluten está muy extendido y crece por arriba de lo que se pensó en los estudios de mercado de comienzos del decenio actual. Se calcula que en el año 2012 sólo en Estados Unidos se generaron ventas por más de 4200 millones de dólares, y se espera que esta cifra aumente hasta más de 6500 millones a finales del año 2017. La tasa anual compuesta de crecimiento se situó en el 2012 en el 28% y, lo que es más importante, la proporción de consumidores de este tipo de productos aumentó del 15 al 18% en tan sólo dos años.<sup>20</sup> Aun así hay que recordar que la base de esta oferta dietética es la “ausencia de gluten” y que en ningún caso se han ofertado productos que, teniendo una ausencia del mismo, presenten alguna característica nutricional o funcional adicional que sea de interés para el enfermo celíaco. Por ello, unos años atrás, Central Lechera Asturiana, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la compañía biotecnológica Biopolis SL se interesaron por esta problemática y decidieron abordar un proyecto de investigación y desarrollo que rindiera un nuevo producto capaz de ayudar a la nutrición del celíaco. Era una apuesta a largo plazo, repleta de incógnitas, pero merecía la pena (Figura 1). Este producto debería cumplir el estar libre de gluten y, además, presentar un perfil nutricional que ayudara a mantener la salud del enfermo celíaco. En las siguientes páginas se describe el desarrollo del mismo que se denomina Proceliac.

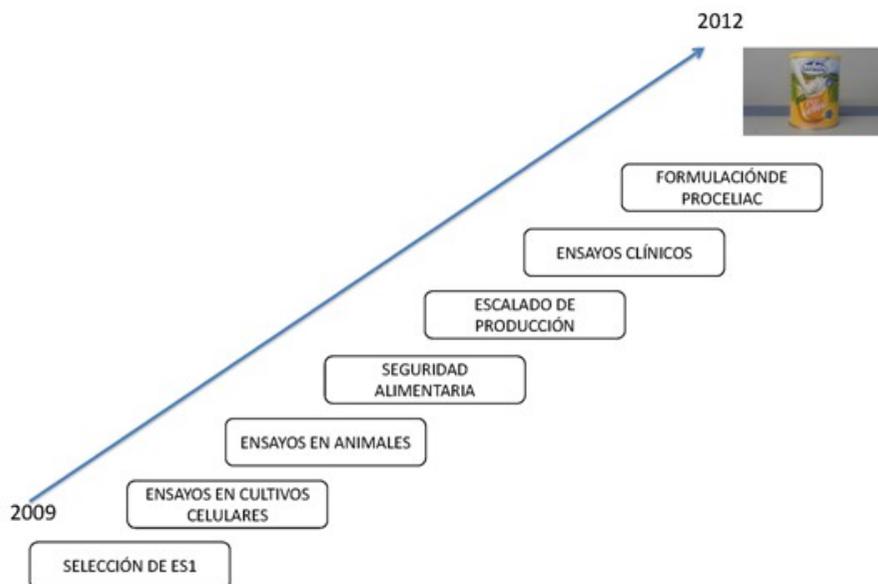


Figura 1. Pasos en el desarrollo de Proceliac.

## 2. Selección del probiótico ES1

La base de Proceliac es una bacteria perteneciente al género *Bifidobacterium longum*. Esta bifidobacteria fue aislada en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del CSIC (IATA-CSIC) por el grupo de la Dra. Yolanda Sanz.<sup>21</sup> Tras escrutar centenares de aislados de bifidobacterias provenientes de heces de niños de menos de tres meses de edad, sanos y sometidos a lactancia materna, encontraron una cepa a la que denominaron ES1 que poseía las propiedades generales de un probiótico. Por un lado, esta cepa resistía valores extremos de acidez y altas concentraciones de sales biliares, por otro sobrevivía al paso por el tracto digestivo, tal y como se comprobó en voluntarios humanos que la ingirieron. También era capaz de adherirse parcialmente a la superficie de células intestinales humanas. Además, inhibía parcialmente el crecimiento de varios patógenos bacterianos presentes en exceso en la microbiota intestinal de los celíacos.

Todas estas propiedades eran importantes, ya que conferían a la cepa ES1 un carácter probiótico. Pero era aun más importante el hecho de que esta cepa degradaba parcialmente muchos de los péptidos de las gliadinas que son responsables del disparo de la inflamación celíaca, como se demostró en un experimento con cultivos en suspensión de células de epitelio intestinal humano Caco-2 a las que se les añadieron muestras de gliadinas previamente sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*. El conjunto se coincubó con células de la cepa ES1 o de otras bifidobacterias y las mezclas de péptidos generadas en cada caso se sometieron a un análisis por RP-HPLC-ESI-MS/MS. Con ello se determinaron los péptidos de degradación generados que se evaluaron en cuanto a su toxicidad. Los resultados indicaron que cada cepa de bifidobacteria producía un conjunto distinto de péptidos de degradación de las gliadinas y que ES1 era la única que no producía los péptidos  $\alpha$ - $\beta$ -Gld (122-141) o  $\alpha$ - $\beta$ -Gld (158-164) que provocan inflamación al interactuar con el receptor CXCR3. Como consecuencia se detectó ausencia de citotoxicidad exclusivamente en la muestra que contenía esta cepa probiótica.<sup>22</sup>

### 3. Capacidad antiinflamatoria de la cepa ES1

En los laboratorios del IATA-CSIC se ha demostrado que esta cepa es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria hasta en tres modelos celulares distintos. El primer estudio se realizó en colaboración con los hospitales universitarios La Fé y General de la Universitat de València. Se tomaron heces de niños celíacos, con sintomatología y sin sintomatología, y también de niños sanos, que se incubaron el probiótico ES1 o un placebo. A su vez el conjunto se coincubó con células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos. Los resultados indicaron que las heces de niños celíacos expuestas al placebo daban lugar a un incremento significativo de la síntesis de la citoquina estimuladora de la inflamación TNF- $\alpha$ . También se detectó un incremento en la producción de CD86 y una disminución de la síntesis de la interleuquina antiinflamatoria IL-10 y la expresión de CD4. En el caso de las heces provenientes de niños con sintomatología se detectó una expresión elevada de IFN- $\gamma$  indicativa de un disparo de la inflamación. Por el contrario, las heces incubadas con el probiótico ES1 no tenían incrementada la síntesis de todos estos marcadores inflamatorios y, por el contrario, sintetizaban más citoquina antiinflamatoria IL-10.<sup>23</sup>

Posteriormente el grupo del IATA-CSIC utilizó otro modelo celular, las células Caco-2 de epitelio intestinal humano, que se trataron con un hidrolizado de gliadinas en presencia o ausencia de la cepa probiótica. Mediante transcriptómica se cuantificó la expresión de varios genes que codifican proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria como el receptor CXCR3, NF- $\kappa$ B y TNF- $\alpha$  y se analizó la producción de marcadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , p50, y los propios NF- $\kappa$ B y TNF- $\alpha$ . Los resultados fueron muy similares a los del estudio anterior, ya que las células epiteliales coincubadas con el probiótico ES1 mostraron un descenso de la transcripción de los genes marcadores de inflamación y, consecuentemente, una bajada en la detección de los mismos.<sup>22</sup>

Finalmente se estudió el efecto de la adición de la cepa ES1 a cocultivos de células dendríticas humanas, células de epitelio intestinal humano Caco-2 y un hidrolizado de gliadinas. En este caso se utilizaron como controles dos enterobacterias aisladas a partir de heces de enfermos celíacos (*Escherichia coli* CBL2 y *Shigella* CBD8). Este trabajo se realizó en el marco de una colaboración entre el IATA-CSIC y el Departamento de Inmunología de la Academia de Ciencias de la República Checa. Los microorganismos patógenos indujeron alteraciones citológicas en las células dendríticas, como la disolución del podosoma, la activación de la adhesión y la propagación, y también un disparo de la expresión de varios marcadores de inflamación como IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ . Estos cambios no se detectaron al añadir la cepa probiótica ES1 que además no activó la adhesión, redujo la expresión de CD40 y CD86 y de IFN- $\gamma$  e incrementó la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10.<sup>24</sup>

Finalmente se realizó un estudio proteómico para analizar el secretoma de células de epitelio intestinal humano Caco-2 cultivadas con un hidrolizado de gliadinas en presencia del probiótico ES1 o de un placebo. Utilizando 2DE y MALDI-TOF se detectó un mayor número de proteínas secretadas en el caso del placebo que en el de la cepa ES1. La mayoría de estas proteínas estaban relacionadas con la desorganización del citoesqueleto, la inflamación y la apoptosis. En el caso del grupo tratado con el probiótico ES1 estas proteínas no se detectaron. Por el contrario se comprobó la presencia de proteínas relacionadas con la supervivencia y la función celular y la homeostasis del calcio. Todo ello era indicativo de una disminución de la toxicidad de las gliadinas.<sup>25</sup>

#### 4. Ensayos en animales de experimentación

A pesar de los múltiples esfuerzos, desgraciadamente no existe un modelo animal de enfermedad celíaca.<sup>26</sup> Tras estos ensayos en modelos celulares, los investigadores del IATA-CSIC decidieron pasar a un estudio en ratas recién nacidas a las que se indujo una enteropatía intestinal por tratamiento con IFN- $\gamma$ . Estas ratas se alimentaron con gliadinas y con un placebo o con el probiótico ES1. Tras el ensayo los animales se sacrificaron y se realizó un estudio histológico del yeyuno, analizando la expresión del gen que codifica NF $\kappa$ B y la producción de diversas citoquinas. También se estudió la producción de poblaciones de leucocitos y de células T. El análisis de los resultados indicó que el grupo de ratas que recibió el placebo presentaba cambios en la estructura del epitelio intestinal, fundamentalmente una mayor infiltración celular, una anchura reducida de los villi y una reducción en la altura de los enterocitos. Por el contrario, el grupo de ratas que había ingerido el probiótico ES1 tenía mejorada la arquitectura de dicho epitelio. Además, las ratas que comieron placebo tenían incrementado el número de células T CD4+, CD4+/Foxp3+ y CD8+. Además, se comprobó que la ingesta del probiótico ES1 reducía la producción de TNF $\alpha$  e incrementaba la de citoquinas antiinflamatorias como IL-10.<sup>27</sup> En un trabajo posterior utilizando el mismo modelo animal se analizó el proteoma de secciones de yeyuno provenientes de animales sensibilizados o no con IFN- $\gamma$  y alimentados con gliadinas, en presencia o ausencia del probiótico ES1, encontrándose sólo diferencias significativas en los animales no sensibilizados que habían ingerido ES1 en comparación con los que no lo habían hecho.<sup>28</sup>

#### 5. Seguridad alimentaria de la cepa probiótica ES1

Todos estos resultados esperanzadores, decidieron el inicio del estudio de seguridad alimentaria de la cepa ES1 que se llevó a cabo en Biopolis SL, siguiendo las recomendaciones de FAO y la Organización Mundial de la Salud.<sup>29</sup> En una primera fase se evaluó la producción por la cepa ES1 de compuestos tóxicos como aminas biógenas o sales biliares desconjugadas. También se cuantificó la productividad de D y L-láctico y su relación, así como los niveles de resistencia a muchos antibióticos de uso hospitalario. No se detectaron valores problemáticos.

En una segunda fase, y en colaboración con el Instituto Pasteur de Montevideo, se realizó un estudio de toxicidad aguda usando ratones normales e inmunodeprimidos mediante tratamiento farmacológico. Ambos grupos se alimentaron con un placebo o con el probiótico ES1. Tras una ingesta de 9 días no se detectaron problemas fisiológicos. Pasado este tiempo los animales se sacrificaron y se realizó un estudio anatomopatológico de todos los órganos, no detectándose alteraciones. Finalmente se analizó la presencia de la cepa ES1 en todos los órganos aislados para detectar su posible translocación. Dicha búsqueda resultó infructuosa, incluso en el caso de los animales inmunodeprimidos.<sup>30</sup>

Además, en Biopolis SL se secuenció el genoma de la cepa ES1 utilizando tecnología de pirosecuenciación masiva, confirmándose a nivel molecular la ausencia de genes relacionados con resistencia a antibióticos, virulencia o factores de patogenicidad. Este estudio permite disponer en estos momentos de la anotación completa del genoma de la cepa probiótica ES1. Sin duda este hecho ayudará a entender las bases moleculares de su comportamiento antiinflamatorio.

## 6. Ensayos clínicos

Tras todo lo expuesto se llevaron a cabo dos ensayos clínicos con el probiótico ES1 en voluntarios humanos. Ambos fueron coordinados por el grupo del IATA-CSIC. En el primero de ellos, a adultos sanos se les suministró el probiótico o un placebo en forma de pastilla durante quince días. Posteriormente se realizó un lavado de dos semanas y se cruzaron los grupos. Ninguno de los participantes en el ensayo manifestó problemas o molestias intestinales o de cualquier otro tipo. Además se analizaron las heces de dichos individuos, determinándose la presencia mayoritaria de la cepa ES1.

En el segundo ensayo clínico se trabajó con niños celíacos que comenzaban una dieta libre de gluten. Se les suministró el probiótico o un placebo durante tres meses. El estudio se realizó en el Hospital Sant Joan de Reus y en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. Los resultados indicaron que algunos productos celulares que están implicados en la respuesta inflamatoria están reducidos de una forma estadísticamente significativa en el grupo que recibió el probiótico ES1. Además, la flora intestinal de los niños que recibieron el probiótico tenía cambios positivos significativos con respecto al grupo que recibió el placebo, reduciéndose los conteos de *Bacteroides* y *Clostridium* y aumentando los de bifidobacterias. En estos momentos se está redactando un artículo científico conteniendo todos estos resultados.

## 7. Desarrollo tecnológico del producto Proceliac

Animados por estos resultados, los investigadores del Departamento de I+D de Central Lechera Asturiana desarrollaron Proceliac. Para ello combinaron el uso del probiótico ES1 con la adición de una serie de nutrientes importantes en el desarrollo (calcio, hierro y vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>5</sub>) o en la respuesta inmune (selenio, zinc y vitaminas A, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>) del individuo normal o del individuo celíaco.<sup>31</sup> Conviene destacar que en el caso del calcio Proceliac cubre el 50% de la dosis diaria recomendada y en el resto de nutrientes tan sólo el 15% (Tabla 1).

El producto es una leche deshidratada baja en grasa que se presenta en dos formatos distintos: un bote familiar con un dosificador que cubre 14 raciones o una caja que contiene 14 sobre unidos (Figura 2). En la actualidad se están desarrollando nuevos conceptos de producto que, basándose en estos desarrollos previos, mejoren la oferta. Por ejemplo, se está finalizando el desarrollo del mismo tipo de productos pero libres de lactosa y adicionados de cacao o vainilla.

Todo lo expuesto en las páginas anteriores permite concluir que Proceliac es un producto lácteo pensado y diseñado pensando específicamente en los celíacos. Es un desarrollo novedoso en el mundo de la dieta libre de gluten al combinar la presencia de un probiótico y venir avalado por una experimentación científica sólida que ya ha dado lugar a publicaciones científicas en revistas de reconocido prestigio. Conviene destacar que mediante su uso se pretende mejorar el estado de bienestar del colectivo celíaco, pero por supuesto, este producto no sustituye la dieta libre de gluten ni permite transgresiones voluntarias. Su papel es otro: paliar la inflamación intestinal y restablecer la microbiota del enfermo celíaco.

Dato de interés	Valor por 30g/vaso de 250 ml	% CDR
Valor energético (Kcal/Kj)	105,9 / 449,6	
Proteína (g)	8,2	
Hidratos de carbono (g) <sup>1</sup>	17,7	
Lactosa(g)	< 0,01	
Glucosa+ Galactosa(g)	12,8	
Dextrosa (g)	4,9	
Grasas (g) <sup>2</sup>	0,25	
de las cuales saturadas (g)	0,16	
Sodio (g)	0,13	
Calcio (mg)	400	50,0
Potasio (mg)	400	20,0
Hierro (mg)	2,1	15,0
Zinc (mg)	1,5	15,0
Selenio (ug)	8,3	15,0
Vitamina A	120	15,0
Vitamina D	1,0	20,0
Vitamina E	1,8	15,0
Vitamina B1	0,17	15,0
Vitamina B5	0,9	15,0
Vitamina B6	0,21	15,0
Vitamina B12	0,38	15,0

Tabla 1. Composición nutricional de Proceliac ( <sup>1</sup> Todos azúcares; <sup>2</sup> Saturadas 0.16 g).



Figura 2. Formatos de Proceliac.

## Referencias

1. Kagnoff MF. *Overview and pathogenesis of celiac disease*. Gastroenterology. 2005; 128: S10-8. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.008>
2. Di Sabatino A, Corazza GR. *Coeliac disease*. Lancet. 2009; 373: 1480-93. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60254-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60254-3)
3. Wieser H, Koehler P. *The biochemical basis of celiac disease*. Cereal Chemistry. 2008; 85: 1-13. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM-85-1-0001>
4. Wieser H. *Chemistry of gluten proteins*. Food Microbiology. 2007; 24: 115-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
5. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM et al. *Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue*. Science. 2002; 297: 2275-9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1074129>
6. Castellanos-Rubio A, Santin I, Irastorza I, Castano L, Carlos Vitoria J, Ramón Bilbao J. *TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin*. Autoimmunity. 2009; 42: 69-73. <http://dx.doi.org/10.1080/08916930802350789>
7. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP et al. *Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation*. Journal of Experimental Medicine. 2009; 206: 525-34. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20081712>
8. Skovbjerg H, Anthonen D, Knudsen E, Sjöström H. *Deamidation of gliadin peptides in lamina propria: implications for celiac disease*. Digestive Diseases and Science. 2008; 53: 2917-24. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-008-0450-4>
9. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN et al. *Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signalling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease*. Immunity. 2011; 21: 357-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.020>
10. González S, Rodrigo L, López-Vázquez A, Fuentes D, Agudo-Ibáñez L, Rodríguez-Rodero S et al. *Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease*. American Journal of Gastroenterology. 2004; 99: 676-80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.04109.x>
11. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA et al. *Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function*. Nature. 2000; 408: 57-63. <http://dx.doi.org/10.1038/35040504>
12. Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. *Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturin gradient gel electrophoresis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2007; 51: 562-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00337.x>
13. Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease*. Journal of Medical Microbiology. 2007; 56: 1669-74. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47410-0>
14. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease*. BMC Microbiology. 2008; 22: 232. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-232>
15. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Specific duodenal and fecal bacteria are associated with pediatric celiac disease*. Journal of Clinical Pathology. 2009; 62: 264-9. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2008.061366>

16. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. *Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects*. British Journal of Nutrition. 2009; 102: 1154-60. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114509371767>
17. Pozo-Rubio T, Olivares M, Nova E, De Palma G, Mujico JR, Ferrer MD et al. *Immune development and intestinal microbiota in celiac disease*. Clinical and Developmental Immunology. 2012; ID 654143. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/654143>
18. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. *Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies*. Gastroenterology. 2009; 137: 1912-33. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.008>
19. Stoven S, Murray JA, Marietta E. *Celiac disease: advances in treatment via gluten modification*. Clinical Gastroenterology Hepatology. 2012; 10: 859-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.06.005>
20. Celiac.com. <http://www.celiac.com/articles/23103/1/Gluten-free-Market-to-Top-66-Billion-by-2017/Page1.html>
21. Sanz Y, Sánchez E, Medina M, De Palma G, Nadal I. *Microorganisms for improving the health of individuals with disorders related to gluten ingestion*. 2009; WO 2009/080862 A1.
22. Laparra JM, Sanz Y. *Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion*. Journal of Cell Biochemistry. 2010; 109: 801-7.
23. Medina M, de Palma G, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Bifidobacterium strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients*. Journal of Inflammation. 2008; 3: 5-19. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-5-19>
24. De Palma G, Kamanova J, Cinova J, Olivares M, Drasarova H, Tuckova L et al. *Modulation of phenotypic and functional maturation of dendritic cells by intestinal bacteria and gliadin: relevance for celiac disease*. Journal of Leukocyte Biology. 2012; 92: 1043-52. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1111581>
25. Olivares M, Laparra M, Sanz Y. *Influence of Bifidobacterium longum CECT 7347 and gliadin peptides on intestinal epithelial cell proteome*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011; 59: 7666-71. <http://dx.doi.org/10.1021/jf201212m>
26. D'Arienzo R, Maurano F, Lavermicocca P, Ricca E, Rossi M. *Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity*. Cytokine. 2009; 48: 254-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2009.08.003>
27. Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. *Bifidobacterium longum CECT7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model*. PLoS ONE 7. 2012; e30744 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030744>
28. Olivares M, Laparra M, Sanz Y. *Oral administration of Bifidobacterium longum CECT7347 modulates jejunal proteome in an in vivo gliadin-induced enteropathy animal model*. Journal of Proteomics. 2012; 77: 310-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.005>
29. FAO/WHO. *Guidelines for the evaluation of probiotics in foods*. Joint FAO/WHO Working Group Report. 2002.
30. Chenoll E, Codoñer FM, Silva A, Martínez-Blanch JF, Bollati-Fogolín M, Crispo M et al. *Genomic sequence and safety assessment of Bifidobacterium longum CECT 7347, a probiotic able to reduce in vitro and in vivo toxicity and inflammatory potential of gliadin-derived peptides*. Enviado para su publicación.
31. Malterre T. *Digestive and nutritional considerations in celiac disease: could supplementation help?* Alternative Medicine Review. 2009; 14: 247-57.