



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral

**Patogénesis de Enfermedad Celíaca: estudio de los
mecanismos de daño en la mucosa intestinal**

Lic. Constanza M. Bondar

Director: Dr. Fernando G. Chirido

2015

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Fernando Chirido en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP, CONICET – UNLP).

La Plata, Febrero de 2015.

A mis abuelos...

Agradecimientos

Este trabajo es producto del esfuerzo y colaboración de muchas personas que lo hicieron posible. A todos ellos, quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

A mi director, Fernando, por darme la posibilidad de trabajar con él y por su gran dedicación.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por brindarme la formación académica. A la UNLP y a CONICET, por otorgarme becas que permitieron mi desarrollo profesional y el desarrollo de mi tesis doctoral. A la Fundación Carolina, por otorgarme una beca que me permitió realizar una estancia en España.

A todos y cada uno de los que me he cruzado a lo largo de estos años en los Servicios de Gastroenterología del Hospital de Niños y del Hospital San Martín de La Plata: miembros del equipo de salud, pacientes y familiares. Es invaluable el aporte de todos ellos.

A todos con los que compartí horas de confocal (y derivados): Vanina, Diana, Loli y Juan; por su infinita paciencia y buena predisposición.

Al Dr. JR Bilbao, Buli, por recibirme y darme la posibilidad de trabajar en su grupo. A todo el Laboratorio de Inmunogenética del Hospital de Cruces de Barakaldo, y vecinos: Nora, Ainara, Leti, Galder, Garbi, Teba y la gente de Onco. Gracias a la Tronkita por abrirme las puertas de su casa, de su gente y acompañarme desde cerca en una experiencia inolvidable.

A Sarita, acá o allá ¡siempre presente!

Gracias infinitas a todos los que hacen, o en su momento hicieron del "LISIN", un gran ambiente de trabajo: Belu, Facu, Maru, Yessica, Vani, Herni, Trejo, JC, Male, Guille, Alberto, Paula, Martin, Ceci, Dom, Agus Z, Gri, Yani... ¡Gracias Dave, Andre, Rodri, Romi C, Juancito, Agustineta, Paolín, Reni, por todo su apoyo técnico-emocional! Gracias a Coca por ser tan Coca, a Lolet por su equilibrio, a la Lu, mi cascabel... A Nicolín, por toda su ayuda y excelente predisposición.

A Saraya Papaya, mi cable a tierra y gran coequiper todo este camino... ¡Gracias por estar!

A mis Amigos de la vida, que en todos estos años me han acompañado y apoyado siempre, mate de por medio, salidas, charlas, catarsis, vueltas y más vueltas. A Vir, Nita, Pety, Marquitos, Caro, Mari y Ger, siempre presentes... Gracias a Manni, Leti, Edu, Ale, Mari, Pao, por sus palabras y su eterna paciencia para escucharme. A Flor y Marola, mis confidentes con años récord aguantándome...

Al apoyo de toda mi Familia... A mis viejos, por su confianza, su cariño, por darme luz. A mis hermanos, incondicionales, ¡gracias por ser como son! A mis sobrinos y sus ocurrencias, sus abrazos y sonrisas reponedoras de energía... A Fede, mi chancho, por acompañarme en este y tantos otros caminos...

Aunque las palabras siempre quedan chicas, a todos ellos, ¡muchas gracias!

Abreviaturas

ADNc: ADN complementario

ARNm: ARN mensajero

BSA: seroalbúmina bovina

CEGEC: consorcio español de genética de la enfermedad celíaca

CD: células dendríticas

CLI: células linfoides innatas

Cr: cromosoma

DLG: dieta libre de gluten

DMEM: medio Dulbecco's Eagle modificado

EAF: epitelio asociado a folículo

EC: enfermedad celíaca

FLA: folículos linfoides aislados

GAGs: glicosaminoglicanos

GALT: tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal

GLM: ganglios linfáticos mesentéricos

GWAS: estudio de asociación de genoma completo

HBSS: solución buffer salino de Hank

HLA: antígenos leucocitarios humanos

IC: intervalo de confianza

Ig: Inmunoglobulina

LIEs: linfocitos intraepiteliales

LP: *lamina propria*

MAF: frecuencia de alelo menor

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

OR: *odds ratio*

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGD: péptidos de gliadinas deamidados

PNR: péptido no relacionado

Poly I:C: *polyinosinic-polycytidylic acid*

PP: Placas de Peyer

PT-Gliadina: gliadinas digeridas con pepsina y tripsina

RE: retículo endoplasmático

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

TCR: receptor de linfocito T

TG2: transglutaminasa 2

TNF: factor de necrosis tumoral

UPR: *unfolded protein response*

UR: unidades relativas

UTR: región no traducida

Resumen:

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica de base inmune que se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles ante la ingesta de un grupo de proteínas derivadas del gluten. Su prevalencia está estimada en un 1-3%. En EC se observa daño a nivel de la mucosa del intestino delgado, caracterizado por atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y un marcado infiltrado linfocitario, tanto a nivel de la *lamina propria* como en el compartimento intraepitelial. Estos cambios conducen a la pérdida de la funcionalidad del intestino delgado y a un síndrome de malabsorción asociado a diversos signos clínicos.

La EC es un desorden multigénico, cuyo factor de susceptibilidad genética más importante está ubicado en el locus del HLA. Prácticamente el 100% de los pacientes, presenta los alelos del HLA codificantes para las moléculas DQ2 o DQ8. Por fuera de este locus, existen varias regiones que han sido asociadas a EC y que albergan genes con funciones inmunes.

El infiltrado de linfocitos T CD4⁺ (Th1) específicos de péptidos de gluten y restringidos al HLA-DQ2/DQ8, presentes en la *lamina propria* de la mucosa duodenal, juega un rol relevante al activarse y producir IFN γ , aportando un microambiente altamente proinflamatorio. También es crítico el accionar de los linfocitos intraepiteliales, que se ven aumentados en el curso de la patología, y cuya citotoxicidad sobre enterocitos colaboraría en la instauración de la atrofia de la mucosa.

Varios son los aspectos de la inmunopatogenia que aún no fueron descriptos. En este trabajo de Tesis abordaremos el estudio de genes candidatos, los mecanismos de migración y de muerte celular en la mucosa de intestino delgado.

Implementando una estrategia de elección de genes candidato posicionales, hemos evidenciado tres genes diferencialmente expresados en el tejido blanco de esta patología: *RUNX3*, *THEMIS* y *PTPRK*, definiéndolos de esta manera como candidatos funcionales. Hemos demostrado además, la participación del eje quimiotáctico CXCR3/CXCL10 en el reclutamiento activo de células mediadoras de daño hacia la mucosa intestinal de pacientes con EC activa, tanto en eventos disparadores de la enfermedad como en el sostenimiento del proceso inflamatorio crónico. Estos resultados sientan precedentes para la evaluación de la determinación sérica de CXCL10 como biomarcador en EC y la inhibición de esta quimoquina como una posible estrategia terapéutica. Finalmente, hemos abordado el análisis de la expresión de moléculas asociadas a estrés de retículo y a vías de muerte celular, pudiendo evidenciar un epitelio intestinal con un marcado estrés de retículo. Nuestras observaciones sugieren que distintas vías de muerte, y no sólo la apoptótica extrínseca como había sido extensamente propuesto, podrían participar activamente en los mecanismos de daño en la mucosa intestinal en EC activa.

Índice de contenidos

Introducción General y Objetivos	1
Conceptos generales sobre Enfermedad Celíaca	2
Factores genéticos asociados a EC.....	4
Diagnóstico y tratamiento	6
Generalidades del sistema inmune en la mucosa intestinal.....	12
Características del gluten y rol de TG2 en la patogenia de EC.....	18
Modelo de inmunopatogenia en Enfermedad Celíaca.....	21
Objetivo General.....	25
Capítulo 1	26
Búsqueda de marcadores genómicos relevantes en la patogenia de la Enfermedad Celíaca.....	27
Introducción	27
Objetivos Específicos	33
Materiales y Métodos.....	34
Pacientes y muestras.....	34
Digestión de gliadinas y BSA	34
Análisis de expresión génica	35
Selección de SNP, ensayos de genotipado y análisis de asociación	35
Cultivo Celular	36
Análisis estadísticos y de correlación	37
Resultados	38
Estudio de asociación alélica evaluando SNPs descriptos en el GWAS.....	38
Estudios de expresión de ARNm de <i>RUNX3</i>, <i>THEMIS</i> y <i>PTPRK</i> en duodeno.....	39
Selección de SNPs y evaluación de la influencia del genotipo en los niveles de expresión.....	40
Análisis de co-expresión de <i>THEMIS</i> y <i>PTPRK</i> en duodeno.....	47
Análisis de la expresión de <i>THEMIS</i>, <i>PTPRK</i> y <i>RUNX3</i> en la línea celular T84	49
Discusión.....	50
Conclusiones	54

Capítulo 2	56
Estudio de la expresión y modulación del eje CXCR3/CXCL10 en Enfermedad Celíaca	57
Introducción	57
Objetivos específicos	63
Materiales y métodos	64
Pacientes y muestras.....	64
Consideraciones éticas	65
Estudios de expresión génica por PCR cuantitativa.....	65
Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	66
Recuento de células CXCR3 ⁺ por inmunofluorescencia.....	67
Determinación de CXCL10 sérico.....	67
Estimulación <i>in vitro</i> de biopsias duodenales.....	68
Digestión de tejido y análisis por citometría de flujo.....	68
Cultivo celular.....	69
Análisis por citometría de flujo de líneas celulares	70
Inmunofluorescencia y recuento celular en Caco-2 estimuladas.....	70
Análisis estadísticos	71
Resultados	72
Análisis de los niveles de CXCL10 en sangre periférica	72
Expresión de los ligandos de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) en mucosa duodenal	73
Correlación de la expresión de los ligandos de CXCR3 con IFN γ , IFN β y TNF α en mucosa intestinal.	75
Patrón de expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en mucosa duodenal y sus fuentes celulares	77
Las poblaciones linfocitarias que infiltran la LP en EC expresan CXCR3.....	82
Expresión de CXCR3 en la población de linfocitos intraepiteliales	85
Análisis de la inducción <i>in vitro</i> de los ligandos de CXCR3 en biopsias duodenales: respuesta a poly I:C, IL-15 o p31-43.....	87
Análisis de la expresión de CXCL10 en líneas celulares	96
Análisis de la inducción de CXCR3 en células modelo de linfocitos T.....	102
Discusión	104
Conclusiones	109

Capítulo 3	112
Estudio de los mecanismos de estrés y de muerte celular en la mucosa duodenal durante la enteropatía celíaca	113
Introducción	113
Objetivos Específicos	124
Materiales y Métodos	125
Pacientes y muestras.....	125
Ensayos de expresión génica por PCR cuantitativa.....	125
Técnica de TUNEL.....	126
Inmunofluorescencia	127
Aislamiento de células y citometría de flujo.....	127
Análisis por western blot de marcadores de vías de estrés y muerte celular.	128
Análisis estadísticos	129
Resultados	130
Evaluación de los niveles de expresión de moléculas asociadas a estrés de RE	130
Evaluación de muerte celular en mucosa duodenal	135
Estudio de vías apoptóticas en mucosa duodenal: expresión de caspasa-8, caspasa-3 y PARP1.....	137
Determinación de los niveles de BAX, BCL2, FAS y FASL en biopsias duodenales ...	141
Análisis de la expresión de RIPK3 en mucosa duodenal	142
Análisis de la expresión de caspasa-1 en mucosa duodenal	144
Evaluación de la proliferación celular en mucosa duodenal	145
Discusión	148
Conclusiones	152
Conclusiones Generales	153
Bibliografía	153

Introducción General y Objetivos

Conceptos generales sobre Enfermedad Celíaca

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica de base inmune que se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles ante la ingesta de un grupo de proteínas derivadas del trigo, avena, cebada y centeno, denominadas en su conjunto prolaminas (Ludvigsson et al., 2013). Dada la predominancia de trigo en nuestros hábitos alimenticios, es común en este contexto referirse a este grupo de proteínas tóxicas como gluten. El gluten es el producto del amasado de la harina de trigo y está compuesto por gliadinas y gluteninas.

En EC se produce daño en la mucosa del intestino delgado, donde se observa en forma característica atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y un marcado infiltrado linfocitario, tanto a nivel de la *lamina propria* (LP) como en el compartimento intraepitelial. Estos cambios conducen a la pérdida de la funcionalidad del intestino delgado y a un síndrome de malabsorción asociado a diversos signos clínicos. EC puede manifestarse a cualquier edad y se estima que está presente entre el 0,5 y el 3% de la población general, siendo más común en mujeres que en hombres (en una relación 2:1). La prevalencia de EC en el mundo es variable (**Figura 1**), y se estima que esta variación es consecuencia de factores étnicos (composición genética), culturales (hábitos alimenticios) y ambientales (infecciones) (Abadie et al., 2011). En particular, en Argentina la prevalencia dentro de la población pediátrica fue estimada en un 1,26% (Mora et al., 2012) y en la población adulta en un 0,6% (Gomez et al., 2001), valores que, por las características de ambos estudios, son estimativos.

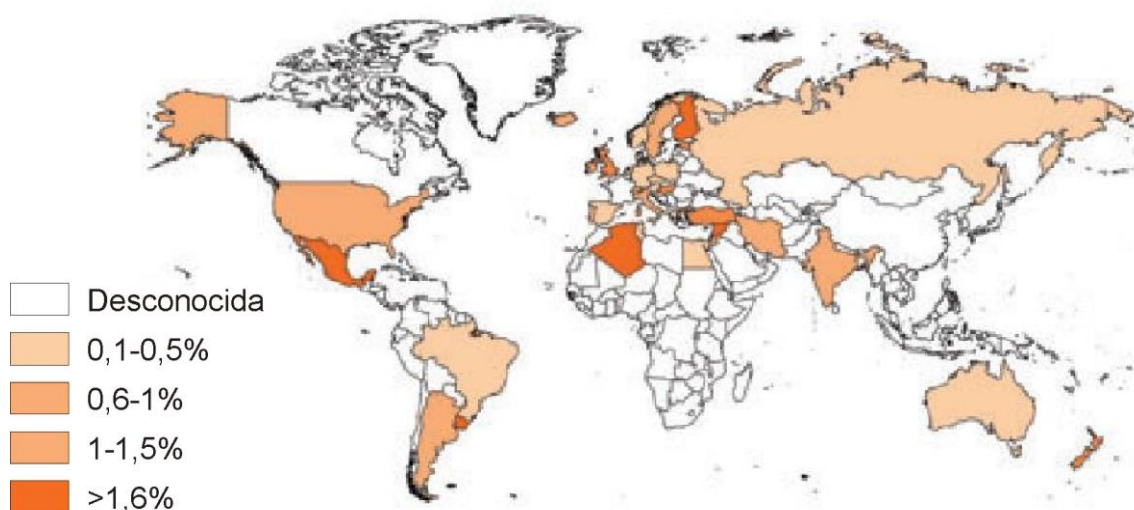


Figura 1. Prevalencia de la Enfermedad Celíaca. Se muestra la distribución geográfica de frecuencias conocidas para EC. Tomado de Abadie et al., 2011.

EC es una enfermedad de base inmune con un importante componente genético. El mayor impacto radica en genes que codifican para moléculas del complejo HLA (*Human Leukocyte Antigen*), en particular los alelos codificantes para las moléculas HLA-DQ2 o DQ8. Prácticamente el 100% de la población celíaca expresa uno de estos alelos, lo que representa la asociación más fuerte encontrada para una patología de base inmune (Trynka et al., 2010; Howell, 2014).

Existe una fuerte asociación entre EC y Diabetes Tipo I, en parte debida a la presencia de alelos de susceptibilidad compartidos, como los del HLA-DQ8 (Eyre et al., 2010). La prevalencia de EC entonces se ve aumentada hasta un 5 a un 15% en pacientes con diabetes tipo I, y también en pacientes que padecen otras enfermedades autoinmunes, como tiroiditis, lupus eritematoso, o síndrome de Sjögren. Otros grupos de riesgo incluyen pacientes con síndrome de Turner o con trisomía 21 (Husby y Murray, 2014).

La presentación clínica de EC es muy variada. La sintomatología más frecuente incluye síntomas gastrointestinales asociados con la malabsorción como diarrea crónica, distensión abdominal y pérdida de peso; pero también incluye manifestaciones extraintestinales secundarias a la malabsorción como anemia (por deficiencia de hierro) u osteoporosis (por deficiencia en la absorción de calcio). En la **Tabla 1** se listan los síntomas más frecuentemente observados en niños y en adultos. En algunos casos puede presentarse una manifestación cutánea llamada dermatitis herpetiforme, caracterizada por depósitos de IgA en la piel, pápulas y vesículas pruriginosas. Esta manifestación puede presentarse aislada de síntomas intestinales y remite con la adherencia a una dieta libre de gluten. De todas maneras, en EC es remarcable la gran proporción de pacientes asintomáticos o pacientes que cursan con signos subclínicos (como cansancio o irritabilidad) (Ludvigsson et al., 2013; Husby y Murray, 2014).

Tabla 1. Signos y síntomas más frecuentes en EC.

Signos y síntomas de EC	
Niños	Adultos
Anemia	
Diarrea	
Pérdida de peso	
Baja estatura	
Anorexia	Abortos a repetición
Distensión abdominal	Osteoporosis
Dolor abdominal	Ataxia
Vómitos	Depresión
Flatulencias	
Retraso del crecimiento	
Fatiga crónica	
Constipación	

Referencias: Ludvigsson et al., 2014; Tonutti y Bizzaro, 2014.

Factores genéticos asociados a EC

La EC es un desorden complejo donde los factores genéticos cumplen un rol crítico. Se trata de un desorden multigénico y, como se mencionó, su factor de susceptibilidad genética más importante está ubicado en el locus del HLA. Dentro de este complejo de genes, ciertas variantes de *DQA1* y *DQB1* están fuertemente asociadas a la EC, y se estima que un 95% de los pacientes presentan los alelos DQA1*05:01 y DQB1*02:01. Estos codifican para la cadena α y β , respectivamente, de la molécula HLA-DQ2, específicamente la variante DQ2.5. Esta variante codificada en *cis* dentro del haplotipo DR3-DQ2 es la más común en pacientes celíacos aunque también puede presentarse en *trans* codificada por dos haplotipos: DR5-DQ7 (contiene el alelo DQA1*05:05) y DR7-DQ2 (contiene el alelo DQB1*02:02). Las configuraciones *cis* o *trans* para esta molécula no tienen diferencias funcionales en cuanto a nivel de expresión ni capacidad de presentación. El restante 5% de los pacientes celíacos portan los alelos DQA1*03:01 y DQB1*03:02 codificantes de la molécula HLA-DQ8, dentro del haplotipo DR4-DQ8, o los alelos DQA1*02:01 y DQB1*02:02 codificantes de la molécula HLA-DQ2.2 dentro del haplotipo DR7-DQ2. Es importante resaltar que la susceptibilidad a la enfermedad depende del efecto dosis del heterodímero DQ2.5, siendo aquellos individuos homocigotas para el haplotipo DR3-DQ2 o los heterocigotas DR5-DQ7/DR7-DQ2 los que expresan

los mayores niveles del heterodímero y por ende portan el mayor riesgo genético para EC (Figura 2) (Sollid y Thorsby, 1993; Sollid, 2002; Abadie et al., 2011).

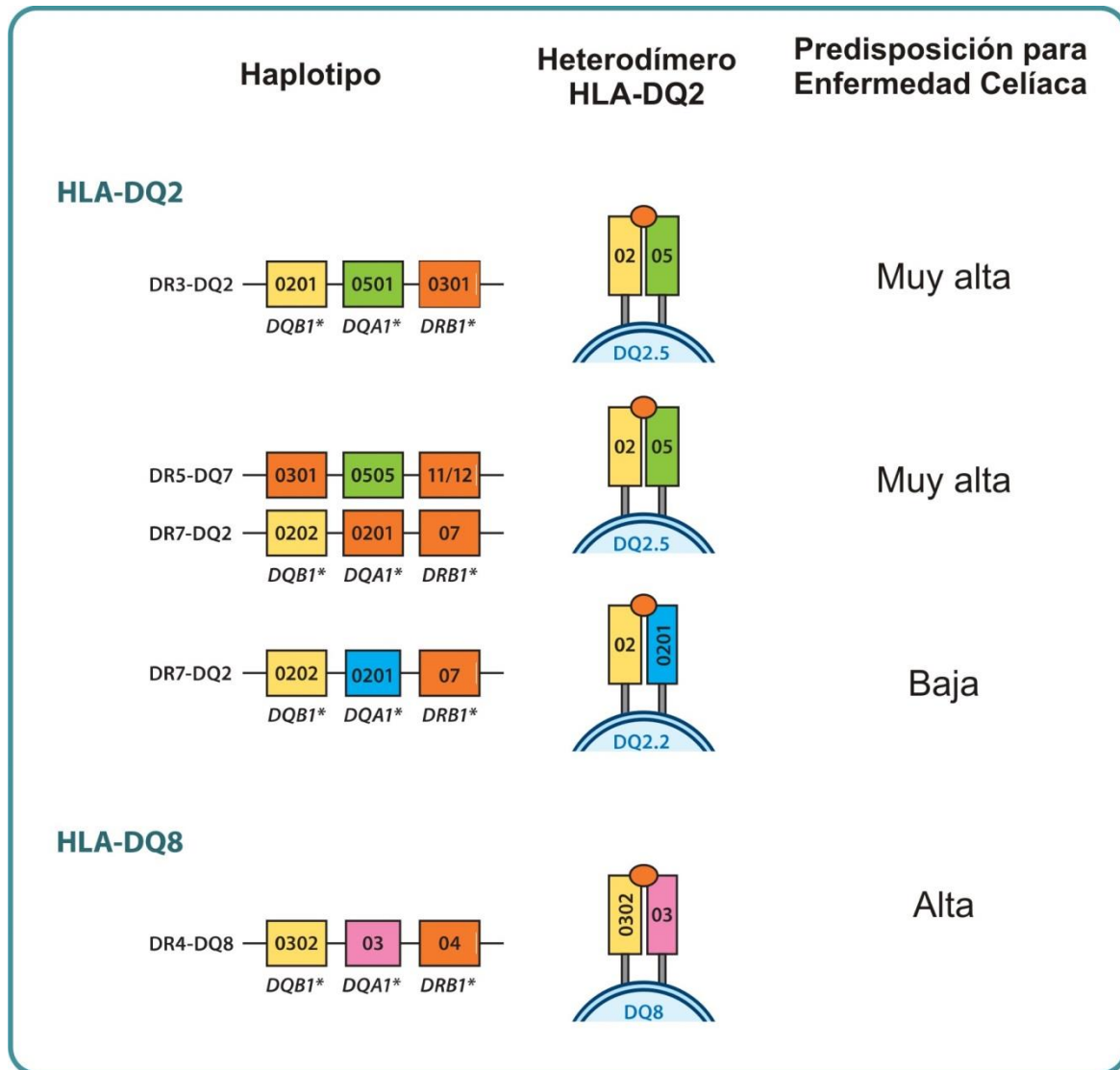


Figura 2. Alelos de susceptibilidad del HLA y Enfermedad Celíaca. La mayoría de los pacientes celíacos expresan el heterodímero HLA-DQ2.5, ya sea codificado en *cis* dentro del haplotipo DR3-DQ2 o en *trans* por los heterocigotas DR5-DQ7/DR7-DQ2. El resto de los pacientes expresan otra variante de la molécula DQ2, el heterodímero DQ2.2, el cual confiere menor riesgo de padecer la enfermedad, o el heterodímero DQ8 codificado dentro del haplotipo DR4-DQ8. Tomado de Abadie et al., 2011.

Dado que en la población general la frecuencia de estos alelos de riesgo para EC ronda el 30% y que sólo 1 al 3% desarrolla EC, está claro que su mera presencia no es factor suficiente para desencadenar la patología. Por otro lado, la contribución de factores genéticos en su conjunto (heredabilidad) en la EC está estimada en un 80%, mientras que el HLA contribuye en un 35% al

riesgo genético para la enfermedad. Esto indica que necesariamente existen otros factores de susceptibilidad genética involucrados. En los últimos años, a través de estudios de asociación sobre todo el genoma (GWAS, *Genome Wide Association Studies*) y diferentes estrategias de genotipado, se han descrito 39 regiones genómicas de asociación con EC distintas a la del HLA. En conjunto, estos trabajos han permitido explicar tan solo un 54% de la heredabilidad de EC (Dubois et al., 2010; Trynka et al., 2011; Kumar et al., 2012).

Muchos de los genes localizados dentro de estas regiones cumplen funciones inmunes y a su vez, varios ensayos realizados sobre sangre periférica han evidenciado relaciones concretas entre genotipo y nivel de expresión de ARNm. Estas señales de asociación y el consecuente análisis de los genes cercanos a ellas, han permitido especificar rutas de señalización que podrían estar alteradas en EC. Por ejemplo, cobra relevancia el desarrollo de linfocitos T en el timo, dado que genes como *THEMIS*, implicado en etapas de educación tímica, y como *RUNX3* y *ETS1*, importantes en la diferenciación de linfocitos CD8⁺, son aledaños a distintas señales de asociación génica. Numerosos genes codificantes para diferentes citoquinas, quimoquinas y moléculas co-estimuladoras de la respuesta inmune también resultaron candidatos posicionales de susceptibilidad a EC (Dubois et al., 2010). A pesar de estos indicios, resta mucho trabajo por hacer con el fin de identificar las numerosas variables genéticas responsables de las alteraciones fenotípicas que contribuyen al desarrollo de la patología.

Diagnóstico y tratamiento

Existen distintos algoritmos diagnósticos que incluyen la observación clínica, estudios de serología y la evaluación histológica de piezas de intestino delgado. Usualmente, lo primero que ocurre es la sospecha clínica a raíz de la sintomatología que, si bien es poco específica y muy variable, juega un rol importante en la inclusión del paciente en un protocolo diagnóstico. También pueden ser sometidos a métodos de diagnóstico aquellos individuos con familiares directos con EC o aquellos que padecen enfermedades asociadas.

Los ensayos serológicos consisten en la detección de anticuerpos de isotipo IgA anti-endomisio (EMA), anticuerpos anti-transglutaminasa 2 (TG2) (isotipo IgA o IgG), y de anticuerpos dirigidos contra péptidos de gliadinas deamidados (PGD) (isotipos IgA o IgG). El descubrimiento de la

presencia de auto-anticuerpos dirigidos contra la enzima TG2 en pacientes celíacos resaltó las características autoinmunes de la enfermedad, a la vez que permitió desarrollar ensayos diagnósticos de rutina consistentes en la detección de estos anticuerpos con una buena sensibilidad y especificidad diagnóstica. La determinación de anticuerpos anti-TG2 o anti-PGD, se realiza sobre muestras de suero por ELISA. Por el contrario, la detección de anticuerpos EMA consiste en ensayos de inmunofluorescencia donde el suero del paciente es incubado con cortes de esófago de mono y la positividad del ensayo está dada por la observación de un patrón de fluorescencia característico (Husby y Murray, 2014; Tonutti y Bizzaro, 2014).

Entre los ensayos serológicos, los más utilizados son la detección de IgA anti-TG2 y EMA; ambos con una alta especificidad y sensibilidad, especialmente al ser aplicados a una población preseleccionada (por sospecha clínica y/o por familiares en primer grado con la patología) (Husby y Murray, 2014; Ludvigsson et al., 2014). Dado que la deficiencia de IgA ocurre con mayor frecuencia en pacientes con EC (1,3%) que en la población general (0,13-0,25%), existe cierto riesgo de arribar a resultados falsos negativos cuando se determinan anticuerpos de este isotipo. Por esto, es parte del protocolo diagnóstico el dosaje de IgA total previo a la elección del test serológico, y en caso de confirmarse una deficiencia proceder al dosaje de IgG anti-TG2 y, de ser posible, IgG anti-PGD. Los métodos de detección de anticuerpos anti-PGD son los más recientemente desarrollados y tienen un gran poder diagnóstico (Husby y Murray, 2014; Tonutti y Bizzaro, 2014).

El diagnóstico confirmatorio de EC requiere la evaluación histológica de la mucosa duodenal. Con este fin, se realiza una endoscopia alta y la toma de biopsias duodenales. Durante la endoscopia se analiza la presencia de diferentes signos sugestivos de EC: disminución en número y altura de los pliegues duodenales, su aspecto festoneado y patrón "en mosaico" o aspecto nodular de la mucosa; aunque la mayoría de estos signos solo se aprecian cuando la atrofia es de grado avanzado (Ianiro et al., 2013). La toma de biopsias comprende entre 4 o 6 especímenes y se realiza en bulbo y segunda porción duodenales. Esto se debe a que en ocasiones ocurre un tipo de lesión en parche donde no existe un compromiso homogéneo a lo largo del intestino. Para evitar un error diagnóstico es necesario entonces analizar varias piezas de diferente localización (Ludvigsson et al., 2013; Tonutti y Bizzaro, 2014). En este sentido hay discrepancias, y trabajos recientes realizados tanto en población adulta como pediátrica han demostrado que en pacientes con atrofia

de la mucosa duodenal, las diferentes secciones anatómicas siempre presentan, si bien variable, algún grado de enteropatía (Murray et al., 2008; Ravelli et al., 2010).

La demostración histológica de atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y un aumento en el infiltrado de linfocitos intraepiteliales (LIEs) son claves para la confirmación del diagnóstico. En la práctica actual, la clasificación histológica globalmente más aplicada es la descrita por Marsh (Marsh, 1992) y modificada por Oberhuber (Oberhuber et al., 1999). Esta clasificación tiene en cuenta el número de LIEs y la apreciación de criptas y vellosidades, y comprende lesiones histológicas de I a IV (**Figura 3**). En nuestro país, algunos patólogos utilizan otra clasificación basada en la morfometría de la mucosa, donde se establece la relación numérica entre altura de vellosidad y profundidad de cripta. En base a ese cociente se establecen los distintos grados de alteración histológica en estadios del I al IV (Drut y Rúa, 2001). Ambas clasificaciones se describen en la **Tabla 2**. En cualquiera de las dos, los grados más altos de lesión son confirmatorios de EC. Los grados intermedios como I o II requieren estudios complementarios y/o un seguimiento del paciente hasta llegar a un diagnóstico definitivo.

Hay que resaltar que la atrofia de vellosidades no es condición unívoca de EC. Ciertas infecciones bacterianas o por *Giardia lamblia* suelen generar características histopatológicas con cierto grado de atrofia, por lo cual es necesario tenerlo en cuenta para el diagnóstico diferencial.

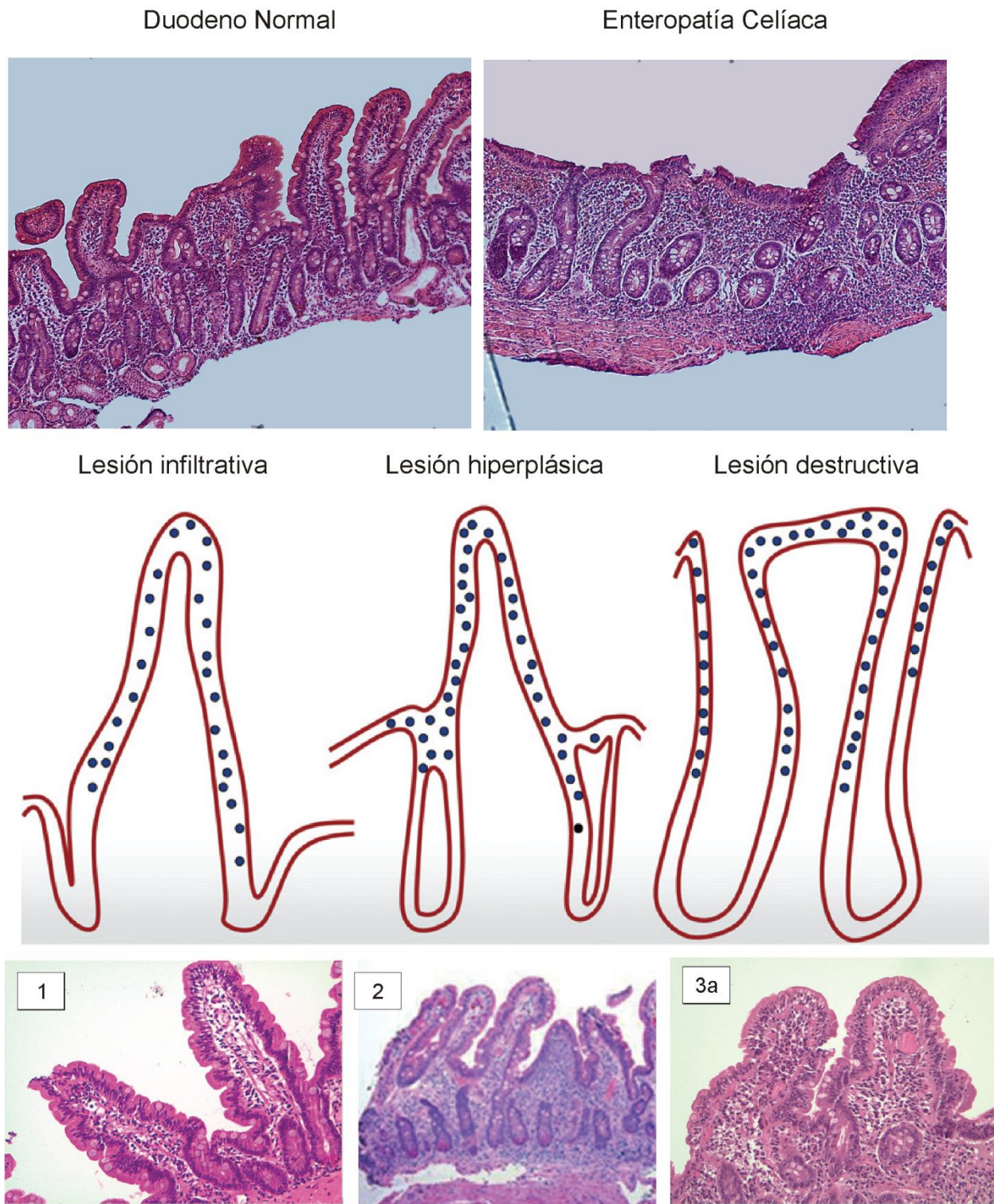


Figura 3. Histología de la mucosa duodenal. Se muestran cortes de biopsias duodenales con la tinción hematoxilina y eosina para una mucosa normal y con enteropatía celíaca de grado avanzado, donde se evidencia la atrofia de vellosidades, engrosamiento de la *lamina propria*, incremento del infiltrado celular e hiperplasia de criptas. Además, se ilustra la lesión infiltrativa, hiperplásica y destructiva según Marsh, esquematizando linfocitos intraepiteliales, criptas y vellosidades. Se observan a modo de ejemplos de enteropatías intermedias, cortes histológicos de biopsias con enteropatía de tipo 1, tipo 2 y tipo 3a. (Villanacci et al., 2011; Husby y Murray, 2014).

Tabla 2. Criterios de clasificación histopatológica en mucosa duodenal.

Clasificación de MARSH		Clasificación de DRUT	
Tipo 0 (normal)	LIEs<40; criptas y vellosidades normal.	Grado 0 (normal)	V/C>2,5
Tipo I (lesión infiltrativa)	LIEs>40; criptas y vellosidades normal.	Grado I	2<V/C<2,5
Tipo II (lesión hiperplásica)	LIEs>40; hiperplasia de criptas y vellosidades normales.	Grado II	1<V/C<2
Tipo III (lesión destructiva)	<u>a LIEs>40; hiperplasia de criptas y atrofia leve.</u> <u>b LIEs>40; hiperplasia de criptas y atrofia marcada</u> <u>c LIEs>40; hiperplasia de criptas y atrofia total.</u>	Grado III	0,5<V/C<1
Tipo IV	LIEs<40; criptas normales y atrofia total.	Grado IV	V/C<2,5

LIEs: linfocitos intraepiteliales cada 100 enterocitos. V/C: relación vellosidad cripta. Se muestra el criterio de LIEs normales descrito por Oberhuber. Actualmente se ha propuesto utilizar como punto de corte 25 LIEs cada 100 enterocitos (Ludvigsson et al., 2014).

Una vez confirmado el diagnóstico de EC, el único tratamiento posible consiste en una estricta adherencia a una dieta libre de gluten (DLG). Cuando los pacientes excluyen el gluten de la dieta, en la mayoría de los casos los síntomas remiten por completo. En general, en unos meses en el caso de pacientes pediátricos, y alrededor de uno o más años en adultos, la lesión a nivel de la mucosa intestinal revierte y se normalizan también los parámetros serológicos. Si bien en el año 1969 la recomendación de la ESPGHAN (*European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) incluía la toma de biopsias duodenales luego de dos años de tratamiento y post-desafío con gluten para confirmación del diagnóstico, actualmente ha sido modificada de manera que, por protocolo, una biopsia que muestra atrofia acompañada del cuadro clínico y parámetros serológicos acordes, es suficientes para definir el diagnóstico de EC. De todas maneras, la respuesta a la dieta con remisión de los síntomas y reducción de los niveles de anticuerpos es un dato que contribuye a la confirmación. Es interesante destacar que si bien no hay una clara correlación entre el daño histológico y la sintomatología clínica del paciente, hay estudios que correlacionan los niveles de anticuerpos IgA anti-TG2 determinados por ELISA cuantitativo con el grado de enteropatía según la clasificación de Marsh (Murray et al., 2008; Ravelli et al., 2010; Husby y Murray, 2014).

Dentro de los pacientes celíacos, existe un subgrupo muy limitado en el que a pesar de adherirse estrictamente a la DLG durante al menos seis meses, los síntomas no remiten. En estos pacientes,

en su mayoría adultos, se debe sospechar de Enfermedad Celíaca Refractaria (ECR). ECR puede ser de tipo I, donde los LIEs presentan un fenotipo normal (con mayoría de CD3⁺ CD8⁺) y repertorio policlonal; o de tipo II, caracterizada por una expansión clonal de LIEs CD3⁺. Esta última condición es con frecuencia la antesala de una transformación maligna, por lo que es considerado un linfoma T intraepitelial o de bajo grado (Malamut et al., 2012).

Como se mencionó, es importante la presencia de pacientes celíacos asintomáticos. Se trata de casos que, a pesar de presentar una serología e histología de la mucosa duodenal típicos de EC, no presentan sintomatología alguna. Estos individuos son diagnosticados cuando, ya sea por ser familiares directos de pacientes con EC o por padecer enfermedades asociadas, son sometidos a un método de *screening* mediante serología. Esta forma de EC es referida como asintomática o silente. Por último, se define la EC potencial en la cual se encuentran aquellos pacientes portadores de alelos de susceptibilidad del HLA, serología positiva para EC y mucosa duodenal normal (Ludvigsson et al., 2013; Tonutti y Bizzaro, 2014).

Es interesante destacar también la existencia de otras condiciones clínicas asociadas al gluten, que han sido descritas en los últimos años. Se trata de “sensibilidad al gluten no celíaca” puesta de manifiesto por una sintomatología similar a la de la EC, que revierte al eliminar el gluten de la dieta. La patogenia de la sensibilidad al gluten es aún poco conocida, y diferiría de EC al incluir exclusivamente mecanismos de la respuesta innata. No se conocen marcadores inmunológicos ni serológicos característicos de esta entidad (Fasano et al., 2014).

El protocolo diagnóstico para EC aquí descrito es el más aceptado en la práctica clínica. Sin embargo, ocasionalmente aparecen inconsistencias entre los datos de serología y la evaluación histológica. En estos casos el paciente ingresa en un protocolo de seguimiento y re-evaluación. En este contexto y para lograr un diagnóstico más eficiente, se ha propuesto incluir en el protocolo la búsqueda de los alelos del HLA de susceptibilidad o el uso de biomarcadores. La tipificación de los alelos de susceptibilidad del HLA con fines diagnósticos tiene un fuerte impacto como criterio de exclusión de EC, puesto que el hallazgo del HLA-DQ2 o DQ8 no es determinante de la presencia de EC. En cambio, la ausencia de los alelos de susceptibilidad es un fuerte predictor negativo de la presencia de EC. Si bien esta es una información complementaria de utilidad, el alto costo de la determinación impide su uso en forma extendida. En el concepto de biomarcador se incluyen por ejemplo los anticuerpos que caracterizan a una patología, que en el caso de EC ya hemos

detallado, u otras moléculas que identifican una condición patológica o definen un estado de actividad. En el caso de EC, aún no hay ningún biomarcador usado en la práctica clínica. Actualmente, el mayor conocimiento de los mecanismos de patogenia y el desarrollo de nuevas plataformas analíticas que pueden detectar moléculas de interés aún en bajas cantidades, permite considerar la utilización de estas herramientas como apoyo en el diagnóstico de enfermedades complejas, especialmente cuando los protocolos actuales no permiten obtener respuestas definitivas.

Generalidades del sistema inmune en la mucosa intestinal

La mucosa intestinal está en contacto con numerosos antígenos provenientes de la dieta y a la vez con los microorganismos de la flora intestinal normal (microbiota). Dado que la mayoría de las infecciones en el ser humano son provocadas por patógenos que acceden al organismo a través de mucosas, incluyendo la gastrointestinal, este tejido ha desarrollado un sistema inmune complejo capaz de generar respuestas efectivas contra organismos patógenos, diferenciándola de aquella respuesta ante antígenos dietarios inocuos o componentes de la microbiota. Esta respuesta diferencial está controlada en parte por el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT). El GALT comprende a linfocitos T y células NK situados en el compartimento intraepitelial y a aquellos que se encuentran dispersos en la LP de la mucosa intestinal. Estos son los llamados sitios efectores dado que allí se desencadenan los mecanismos efectores de la respuesta. También son parte del GALT los sitios inductores, donde se origina la respuesta, y comprenden a las Placas de Peyer (PP), los Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM) y los folículos linfoides aislados (FLA). A diferencia de los GLM, las PP y los FLA no son encapsulados y carecen de vasos linfáticos aferentes. Las PP son agregados linfoides macroscópicos constituidos por folículos de linfocitos B y áreas T, y son particularmente escasos en duodeno (aumentando a lo largo del intestino delgado). Los FLA son agregados microscópicos y están principalmente compuestos por linfocitos B. Ambos tienen, al igual que los GLM, vasos linfáticos eferentes (Mowat y Agace, 2014; Randall y Mebius, 2014).

El epitelio intestinal cumple un rol fundamental al constituir una barrera física y bioquímica para los microorganismos de la flora comensal y patógenos, y al mantener una comunicación activa con

células del sistema inmune, participando así en la regulación del curso de la respuesta homeostática o inflamatoria. El epitelio es una capa simple de células organizado en criptas y vellosidades. En las criptas residen las células de Paneth, encargadas de producir y secretar al lumen proteínas con capacidad antimicrobiana. Esto sumado a la acción de mucinas secretadas por células caliciformes, constituyen elementos centrales en la barrera epitelial. En la base de las criptas se localizan células madre pluripotenciales que permiten una renovación continua del epitelio intestinal al regenerar todos los tipos de células epiteliales maduras (Peterson y Artis, 2014). En la **Figura 4** se esquematiza la estructura de la mucosa del intestino delgado y sus componentes celulares.

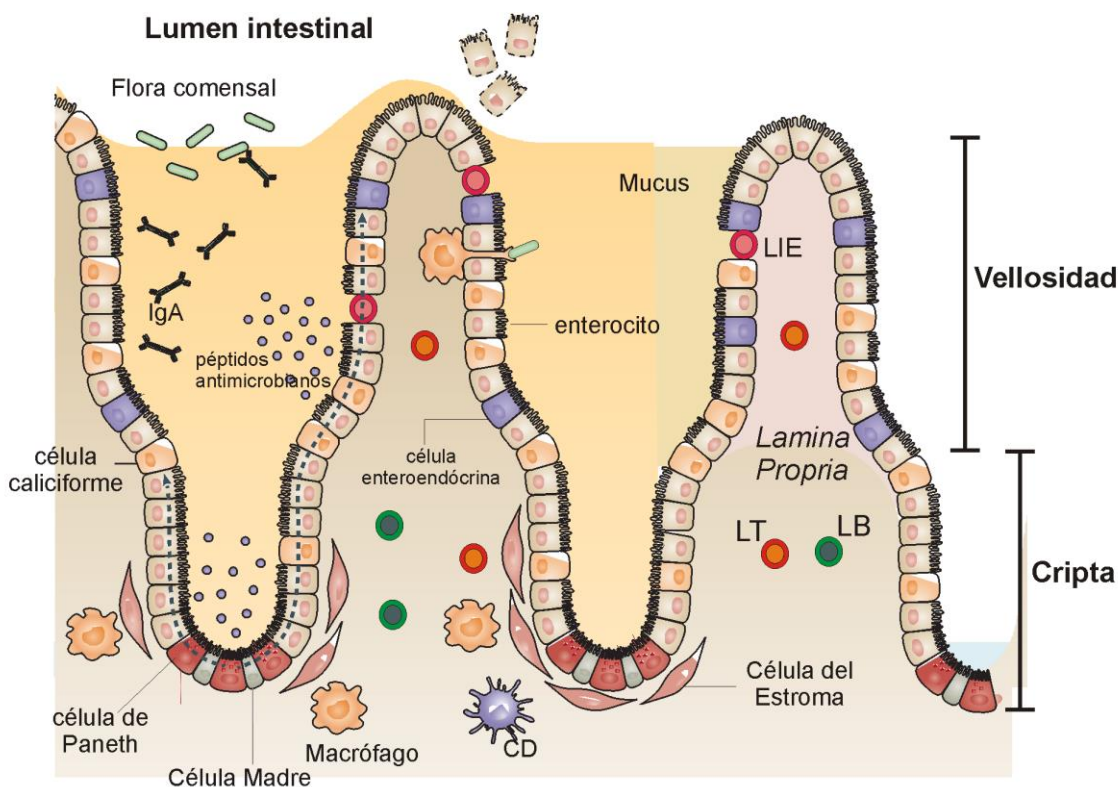


Figura 4. Mucosa intestinal. El epitelio está formado por una capa de células simple que se regenera continuamente a partir de células madre pluripotenciales ubicadas en las criptas. Estas células dan origen a enterocitos que migran completando su maduración hacia el ápice de la vellosidad donde al poco tiempo mueren y son reemplazados. Estas células madre epiteliales también dan origen a células de Paneth, que residen en la base de la cripta y son productoras de compuestos antimicrobianos; células caliciformes productoras de mucinas, principal componente del mucus que constituye una importante barrera fisicoquímica para los microorganismos; y células enteroendocrinas. El epitelio está organizado en criptas (invaginaciones) y vellosidades (proyecciones digitiformes) y contiene además linfocitos intraepiteliales (LIEs). La *lamina propria* está constituida por tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos y linfáticos y diversos tipos celulares: células del estroma, linfocitos B (LB), linfocitos T (LT), macrófagos, células dendríticas (CD), entre otras. *Modificado de Peterson y Artis, 2014.*

Para que el sistema inmune los reconozca, los antígenos deben ser capturados por células presentadoras de antígenos. Existen varios mecanismos para que esto suceda. Uno de los más caracterizados es el llevado a cabo por células M, células epiteliales especializadas concentradas en el Epitelio Asociado a Folículo (EAF) que recubre el lado luminal de FLA y PP. Las células M, a diferencia de los enterocitos carecen de microvellosidades, y por lo tanto, no pueden anclar una capa normal de mucus. Además poseen una intensa actividad endocítica y escasa actividad degradativa, propiedades que le permiten transportar desde el lumen intestinal, antígenos de variado tamaño incluyendo microorganismos. Estos antígenos son capturados por células dendríticas (CD) del domo de las PP, un lugar con alta densidad de estas células ubicado por debajo del EAF. Estudios recientes han revelado que las células caliciformes también mediarían el pasaje transcelular de pequeños antígenos solubles desde el lumen a CD de la LP (Knoop et al., 2013; Peterson y Artis, 2014).

A lo largo de todo el epitelio, las células epiteliales adyacentes se conectan mediante uniones estrechas, permitiendo únicamente el pasaje de pequeños metabolitos. En ocasiones, la expresión diferencial de claudinas (proteínas de la unión) permite la formación de un poro de mayor tamaño por el cual pueden entrar macromoléculas como proteínas y carbohidratos. Los antígenos que entran por esta vía paracelular son capturados por CD de la LP o drenan directamente en los ganglios linfáticos (Knoop et al., 2013; Mowat y Agace, 2014). De manera similar pueden llegar antígenos desde el lumen a través de las células epiteliales, por vías endocíticas transcelulares (Pabst y Mowat, 2012; Schulz y Pabst, 2013).

Finalmente, existen CD y macrófagos especializados del intestino capaces de prolongar dendritas entre células epiteliales y capturar antígenos lumbinales. Entre los fagocitos mononucleares de intestino se distinguen dos poblaciones principales, CD CD103⁺ y macrófagos CX3CR1⁺. Algunos estudios atribuyen exclusivamente este mecanismo a células CX3CR1⁺, incapaces de activar células T y con escasa capacidad migratoria, pero capaces de transferir antígenos a CD CD103⁺. Otros estudios han revelado que CD CD103⁺ de LP son en efecto, capaces de realizarlo (Knoop et al., 2013; Schulz y Pabst, 2013). La información disponible a la fecha sobre estos procesos fue obtenida en modelos de ratón y no hay descripciones funcionales sobre la actividad de estas células en humano. En la **Figura 5** se esquematizan las principales vías de acceso de antígenos desde el lumen intestinal.

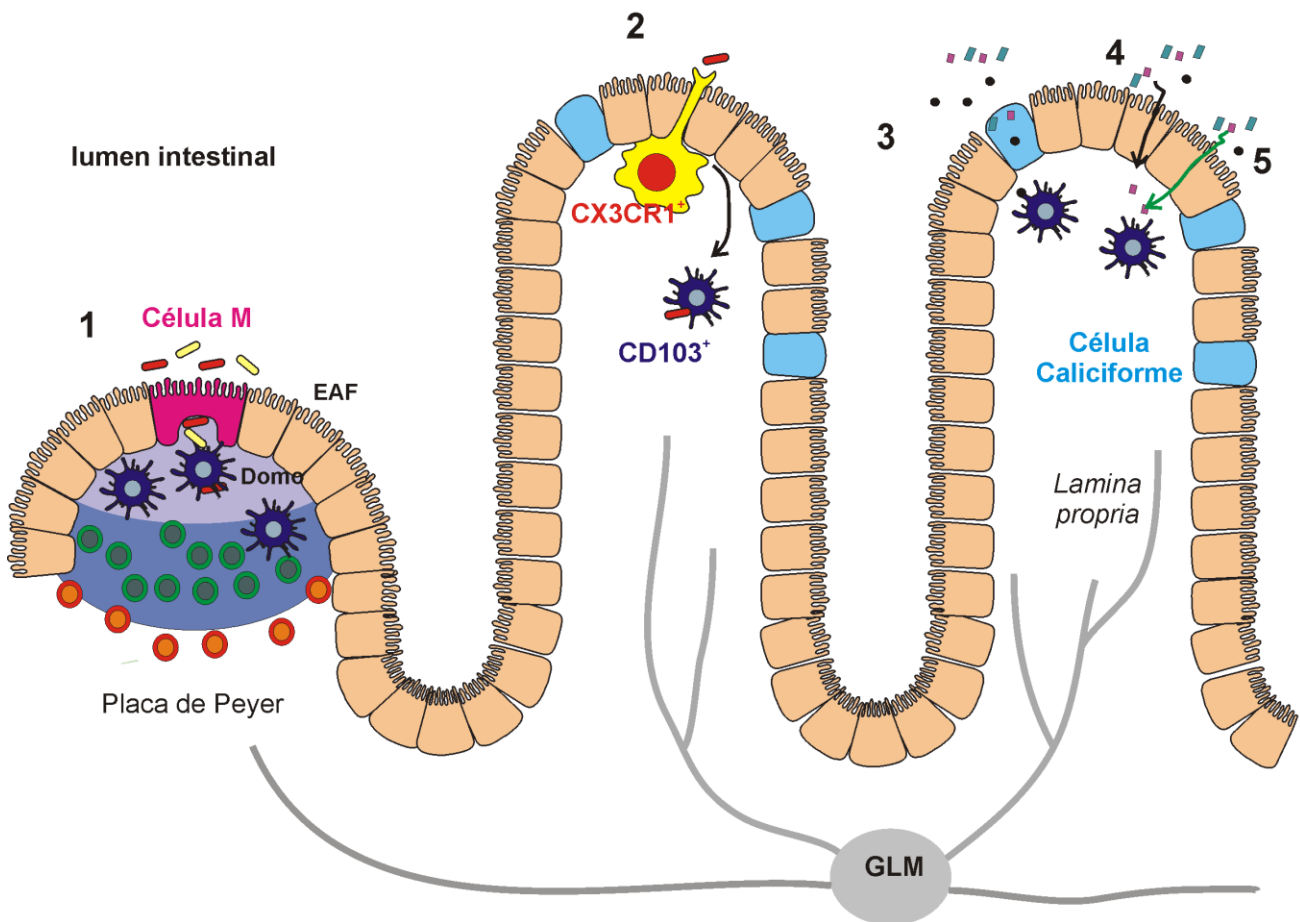


Figura 5. Muestreo de antígenos en la mucosa de intestino delgado. Esquema basado en datos experimentales obtenidos en ratón. **1)** Las células M del epitelio asociado a folículo son una importante vía de ingreso de antígenos particulados y microorganismos. Estos antígenos son capturados por células dendríticas (CD) del domo. **2)** Células CX3CR1⁺ emiten prolongaciones entre enterocitos en las vellosidades, manteniendo uniones estrechas, y capturan antígenos luminales. Estas células no tienen capacidad migratoria pero pueden transferir el antígeno a CD CD103⁺ que sí son capaces de migrar y dirigirse a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM). **3)** A través de las células caliciformes pueden ingresar antígenos solubles y ser capturados por CD CD103⁺. **4)** El enterocito es capaz de mediar el ingreso de antígenos por vías transcelulares. **5)** El pasaje paracelular a través de poros en las uniones estrechas constituye otra vía de ingreso. Estos antígenos solubles son capturados por CD residentes de la LP o pueden dirigirse al ganglio por vasos linfáticos.

En condiciones homeostáticas, las CD CD103⁺ cargadas con antígenos que migran al GLM tienen la capacidad de inducir la generación de células T reguladoras Foxp3⁺ e imprimirlas un patrón de moléculas características de *homing* a intestino. El perfil tolerogénico de estas CD está dado principalmente por la producción de TGFβ y ácido retinoico. Estos linfocitos T reguladores, arriban a la LP donde se expanden bajo la acción de IL-10, producida principalmente por macrófagos CX3CR1⁺. El sostenimiento de los linfocitos T reguladores estaría mediado también por el

reconocimiento antigénico en LP. Estas células producen TGF β y participan en la respuesta no inflamatoria de producción de IgA contra antígenos presentes en el lumen intestinal (Pabst y Mowat, 2012). La IgA es producida por linfocitos B del centro germinal de estructuras del GALT, especialmente las PP, pero también FLA y GLM. Las células B productoras de IgA específica emergen de estos sitios inductores hacia la circulación general y retornan a la LP intestinal donde pueden diferenciarse a células plasmáticas. La IgA así producida forma dímeros y es secretada al lumen por un proceso mediado por el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) ubicado en la cara basolateral del enterocito. Los dímeros de IgA en el lumen intestinal generan un proceso de exclusión inmune por el cual se evita la adherencia al epitelio de microorganismos y toxinas, evitando su ingreso al tejido (Gutzeit et al., 2014).

Los medidores de *homing* más relevantes en este sistema son la integrina $\alpha 4\beta 7$ y el receptor de quimoquinas CCR9. La integrina $\alpha 4\beta 7$ interactúa con MADCAM1 (*mucosal addressin cell-adhesion molecule 1*) expresada constitutivamente en las vénulas que irrigan la mucosa intestinal, y permite la extravasación de las células que la expresan. Por otro lado, CCR9 interacciona con el ligando CCL25 expresado por diferentes células de la mucosa intestinal. Una vez que ingresan a la mucosa los linfocitos se distribuyen de manera diferente. Como mencionamos, las células B precursoras de células plasmáticas permanecen en la LP. Allí también se encuentran linfocitos T CD4⁺, mayoritarios respecto a los linfocitos T CD8⁺ en este compartimento. En cambio en el compartimento intraepitelial, los linfocitos T CD8⁺ constituyen la mayoría de los LIEs. Tanto en la LP como en el epitelio predominan células con un fenotipo de memoria, es decir, células que ya han sido activadas en forma antígeno-específica (Shale et al., 2013).

En el contexto de una situación inflamatoria como una infección o ciertas condiciones patológicas, la presencia de diferentes citoquinas del entorno impacta sobre las células dendríticas que migran a los GLM de manera que, al interactuar con linfocitos T CD4⁺, inducen su diferenciación hacia un perfil efector. Los linfocitos T diferenciados pasan a la circulación periférica y retornan a la LP para generar una respuesta protectora. La naturaleza de la presentación antigénica y el microambiente que la rodea determina en gran parte la identidad o perfil que adquiere el linfocito T CD4⁺. Existen distintos perfiles, cada uno asociado a un determinado grupo de citoquinas del entorno y a la activación de ciertos factores de transcripción que dirigen la expresión de determinadas citoquinas (**Tabla 3**). Si bien estos perfiles están bien caracterizados, el concepto de que los mismos pueden

ser inter-convertibles, o la existencia de perfiles “híbridos” está siendo cada vez más avalado (Brucklacher-Waldert et al., 2014).

La caracterización convencional de los linfocitos del perfil Th1 indica que son generados en respuesta a infecciones intracelulares de bacterias y virus. Las citoquinas del entorno que favorecen su diferenciación son IL-12 e IFN γ . Estas señales activan la expresión del factor de transcripción T-bet y de IFN γ , típicos de este perfil. En cambio, un entorno enriquecido en IL-6, IL-1 β y TGF β favorece una diferenciación hacia un perfil Th17, células secretoras de IL-17A e IL-17F. Estas citoquinas promueven el reclutamiento y desarrollo de neutrófilos. También secretan IL-22, que juega un rol importante en la función de la barrera epitelial. Tanto el perfil Th1 como el Th17 juegan importantes roles en la respuesta inflamatoria, sin embargo también están presentes en niveles basales en la mucosa intestinal no inflamada (Maynard y Weaver, 2009).

Tabla 3. Perfiles de linfocitos T CD4⁺ efectoras.

Células T CD4⁺ efectoras en intestino					
Perfil	Señales de diferenciación	FT	Marcadores	Localización (homeostasis)	Algunas funciones características
Th1	IL-12, IFN γ	Tbet, STAT1, STAT4, Runx3	CXCR3, IFN γ	GLM, PP, FLA, LP	Respuesta ante patógenos intracelulares
Th2	IL-4, IL-2	GATA-3, STAT6, STAT5	IL-33R, IL-4, IL-13, IL-5	raras o ausentes	Respuesta ante helmintos
Th9	TGF β , IL-4	PU.1	IL-9	no se conoce	Respuesta alérgica, inflamación, inmunología de tumores
Th17	IL-6, TGF β , IL-1 β , IL-23, IL-21	ROR γ t, STAT3, Batf, Runx1, ROR α	CD161, IL-17A, IL17F, GM-CSF	GLM, PP, FLA, LP	Respuesta ante infecciones
Th22	IL-6, IL-13, TNF α	AhR	CCR4, CCR6, CCR10, IL-22	no se conoce	Inducción de antimicrobianos, reparación de daño
Tfh	IL-6, IL-21	Bcl-6, Acl2	CXCR5, PD-1, IL-21	PP	Inducción de producción de IgA por células B del centro germinal
iTreg	TGF β , IL-2	Foxp3, STAT5	IL-10, TGF β	GLM, PP, FLA, LP	Capacidad supresora

Se describen para cada perfil sus señales de diferenciación más características, los factores de transcripción (FT) más relevantes inducidos durante su diferenciación, los marcadores de superficie y citoquinas típicamente producidas. También se detalla la localización preferencial de los distintos perfiles dentro de la mucosa intestinal en condiciones homeostáticas y sus funciones clásicas. Tfh: linfocito T *helper* folicular; iTreg: linfocito T regulatorio inducible. Tomado de Brucklacher-Waldert et al., 2014.

Finalmente, hay que resaltar el rol de las “células linfoides innatas” (CLI), un grupo de células heterogéneo de morfología linfoide que carecen de receptor antigénico específico. Sus funciones son relevantes en etapas tempranas de una infección, en la reparación de tejido y en el mantenimiento de la barrera epitelial, entre otras. Sin embargo, algunas de estas células han sido ligadas al desarrollo de enfermedades inflamatorias (Spits et al., 2013).

Para su clasificación estas células se han separado en tres grandes grupos: CLI1, CLI2 y CLI3. CLI1 incluye a las células Natural Killer (NK), dependientes del factor Tbet y de la citoquina IL-15 para su diferenciación y función óptimas. Al activarse, secretan mediadores proinflamatorios como $INF\gamma$ y $TNF\alpha$, y tienen funciones citotóxicas al secretar perforinas y granzimas sobre células blanco. Otro subgrupo importante son las células NKT, que expresan receptores característicos de células T y de NK. Las células NKT reconocen estructuras lipídicas o glicolipídicas unidas a moléculas CD1d (análoga a MHC de clase I). Se han descrito varios subtipos en el tracto gastrointestinal, tanto en LP como en el compartimento intraepitelial. La población más estudiada ha sido la de las NKT invariantes (iNKT), con funciones inmunoregulatoras. En el CLI2 se encuentran células secretoras de citoquinas que asemejan a las Th2 (IL-4, IL-5, IL-13); y en el CLI3 se incluye un subgrupo heterogéneo caracterizado por su habilidad de producir IL-17A y/o IL-22, incluyendo a las células LTi (*lymphoid tissue-inducer*) que participan en la formación de órganos linfoides secundarios durante la embriogénesis (Montalvillo et al., 2014).

Características del gluten y rol de TG2 en la patogenia de EC

Las prolaminas son proteínas ricas en residuos hidrofóbicos de glutamina y prolina. En el caso del trigo, comprenden gluteninas y gliadinas, y son las que contienen un mayor número de fragmentos inmunogénicos identificados. En prolaminas derivadas de cebada (hordeínas), centeno (secalinas) y avena (aveninas) también se han identificado péptidos inmunogénicos, aunque en estas últimas la situación es discutida (Molberg et al., 2005).

Dada su secuencia de aminoácidos, las prolaminas presentan una elevada resistencia a la acción de enzimas digestivas, lo que permite que lleguen al lumen intestinal en forma de péptidos relativamente largos (10 a 50 residuos). Estos fragmentos pueden acceder intactos a la LP por mecanismos de pasaje protegidos que emplean la formación de complejos inmunes con IgA

específica y la traslocación mediante CD71. Una vez en la LP, estos péptidos son excelentes sustratos para la TG2 (Matysiak-Budnik et al., 2008; Abadie et al., 2011).

La enzima TG2 es de localización intra y extracelular, y ejerce su acción sobre ciertos residuos de glutamina (especialmente situados a un aminoácido de distancia de uno de prolina) provocando puentes glutamil-lisina de alta resistencia o “*cross link*” sobre sus sustratos. En ausencia de un aceptor de transferencia adecuado, se produce la hidrólisis y conversión de residuos glutamina en glutamato. En particular este último evento es clave en la patogenia de EC (Klöck et al., 2012).

Luego de una estimulación *in vitro* con péptidos de gluten sobre biopsias duodenales de pacientes con EC pero no de controles, pueden aislarse linfocitos T CD4⁺ específicos de péptidos de gluten. Este reconocimiento está típicamente restringido al contexto del HLA-DQ2/DQ8, lo que explica la importante asociación observada entre EC y los alelos de susceptibilidad. Dado que los huecos de presentación de estas moléculas tienen preferencia por residuos con cargas negativas, la mayoría de estos linfocitos T específicos de gluten tienen preferencia por péptidos que han sido deamidados por TG2, y por ende han adquirido carga negativa y mayor afinidad por estas moléculas del HLA (**Figura 6**) (Qiao et al., 2012).

En condiciones fisiológicas, la TG2 se encuentra mayormente en su forma inactiva. La modulación de su actividad es compleja y depende en gran medida de las concentraciones de calcio, GTP/GDP y del entorno redox. En la matriz extracelular, TG2 puede activarse por la acción de IFN γ de manera indirecta a través de la inducción en monocitos de la liberación del cofactor tioredoxina. Como IFN γ es producido por linfocitos T CD4⁺ específicos del gluten al ser activados, este aspecto constituiría un circuito de amplificación en la respuesta al gluten. Por otro lado, la TG2 intracelular puede activarse bajo ciertas señales de estrés (Bayardo et al., 2012; Klöck et al., 2012). Un evento disparador como una infección viral podría activar la enzima o bien, en un marco de inflamación con daño tisular, liberar la TG2 intracelular. La respuesta específica de linfocitos T CD4⁺ contra péptidos del gluten podría generarse entonces en una primer instancia contra las formas nativas y más tardíamente contra las formas deamidadas (Abadie et al., 2011).

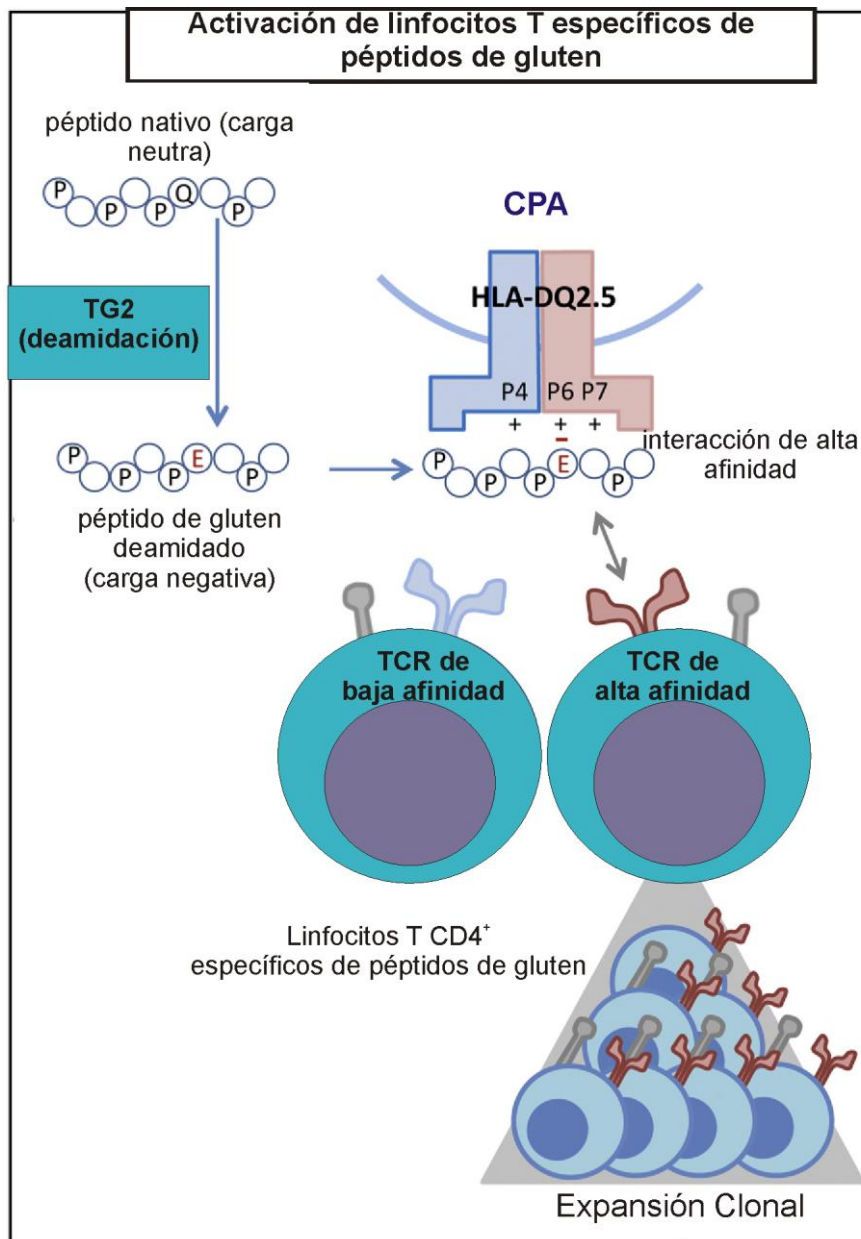


Figura 6. Activación de linfocitos T CD4⁺ específicos de gluten. La enzima TG2 actúa sobre residuos de glutamina en péptidos derivados del gluten y los transforma en glutamato. Estos péptidos, ahora con carga negativa, interactúan con residuos de lisina cargados positivamente en bolsillos de la molécula HLA-DQ2.5 (posición P6), resultando en una unión de alta afinidad. Estas moléculas del HLA cargadas con péptidos en la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA) permiten la activación de linfocitos T CD4⁺ específicos. Esto ocurre en los GLM y es seguido de una selección y expansión clonal de linfocitos con TCR de alta afinidad. La molécula HLA-DQ8 se comporta de manera análoga a la aquí descrita. *Tomado de Meresse et al., 2012.*

La existencia de anticuerpos dirigidos contra TG2 es característica en pacientes con EC. Sin embargo, su rol en la patogenia no ha sido completamente esclarecido. Los mismos son producidos a nivel de la mucosa del intestino delgado en pacientes celíacos no tratados, y se localizan preferencialmente en la membrana subepitelial. Distintos trabajos *in vitro* han mostrado

que los anticuerpos anti-TG2 influirían tanto en la proliferación como diferenciación de enterocitos, y en el mantenimiento de la barrera epitelial. Sin embargo existen en la bibliografía descripciones contradictorias en referencia al rol patogénico de estos anticuerpos (Qiao et al., 2012).

La presencia en LP de linfocitos T CD4⁺ específicos de péptidos derivados de gluten y restringidos a los alelos de susceptibilidad, expone la relevancia de la respuesta adaptativa en la patogenia de EC. Sin embargo, diversos estudios muestran además efectos directos de los péptidos derivados del gluten sobre células de la inmunidad innata y el epitelio. Es decir que en las prolaminas se encuentran péptidos inmunogénicos, que son presentados en el contexto de las moléculas HLA-DQ2 o DQ8, y otros péptidos, denominados tóxicos, que no se unen a moléculas del HLA y tienen propiedades proinflamatorias asociadas a mecanismos de la inmunidad innata. Estos últimos son especialmente interesantes por su posible rol en eventos tempranos de la patología (Ciccocioppo et al., 2005). El péptido p31-43, derivado de α -gliadinas, ha sido el más estudiado dentro de este grupo. Entre sus efectos constan la inducción de apoptosis en enterocitos mediante la inducción de moléculas del HLA no clásicas como MICA y la potenciación de la actividad citotóxica de LIEs, en parte a través de la inducción de IL-15 (Maiuri et al., 2003; Hübner et al., 2004). Por otro lado, se ha descrito que p31-43 induce la proliferación de enterocitos, un efecto mediado por la prolongación en la señalización vía EGFR (*epithelial growth factor receptor*) y el incremento en la transpresentación de IL-15, aspectos que podrían explicar al menos parcialmente la hiperplasia de criptas observada en EC (Barone et al., 2007, 2011; Nanayakkara et al., 2013a).

Aunque resta caracterizar y esclarecer esta diversidad de efectos innatos de péptidos derivados del gluten, la existencia de estos mecanismos tiene implicancias directas en el daño en la mucosa intestinal, amplifican la respuesta específica de los linfocitos T CD4⁺ Th1 contribuyendo a la cronicidad de la lesión, y serían el factor responsable en el desencadenamiento de la sensibilidad al gluten no celíaca.

Modelo de inmunopatogenia en Enfermedad Celíaca

Los estudios originales de caracterización de la reactividad y restricción de los linfocitos T de LP en EC activa realizados a comienzos de la década de los 90' permitieron establecer las bases para el conocimiento de los mecanismos de su patogenia. EC es tal vez una de las patologías de base

inmune conocidas con más detalle, aun así existen fases de relevancia que no han sido estudiadas o esclarecidas.

En LP de pacientes con EC, existe un importante infiltrado de linfocitos T CD4⁺ del perfil Th1 productores de IFN γ . Una de las preguntas claves en EC es cómo puede generarse esta respuesta específica ante la ingesta de gluten en determinados individuos. Ciertas hipótesis sostienen que podría existir una alteración en la generación de células T regulatorias, las principales encargadas de instaurar tolerancia ante antígenos dietarios. Dado que la mucosa de pacientes celíacos es un entorno con elevada IL-15 e IFN α , en este contexto, las células dendríticas diferencian a células proinflamatorias en vez de regulatorias. Otra consecuencia del incremento de IL-15 repercute directamente sobre los linfocitos T anulando los efectos regulatorios de TGF β sobre ellos. El rol de los linfocitos T CD4⁺ específicos de gluten en la patogenia de EC está ligado en parte a su capacidad de generar un ambiente adecuado para la actividad de LIEs citotóxicos, principalmente a través de la secreción de IFN γ e IL-21. Por ejemplo, IFN γ induce moléculas MHC de clase I no clásicas en enterocitos; e IL-21 puede actuar de manera sinérgica con IL-15 en la activación de LIEs citotóxicos. Por otro lado, también son estos linfocitos T CD4⁺ activados los que permiten la diferenciación de linfocitos B específicos de gluten o de TG2 a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Como se ha mencionado, el rol de los anticuerpos en la patogenia es discutido, pero contribuyen al circuito inflamatorio en esta patología al favorecer el pasaje de complejos de anticuerpos y péptidos de gluten hacia la LP (Jabri y Sollid, 2009; Abadie et al., 2011; Qiao et al., 2012).

Dado que en la enteropatía celíaca las criptas se hallan en un estado hiper-proliferativo es de suponer que el blanco de los procesos destructivos está en las células epiteliales lumbinales. Esto está soportado también por la elevada presencia de LIEs desde los comienzos de la enteropatía. Los LIEs citotóxicos expresan el receptor de activación NKG2D que les permite ejercer su acción más allá de su especificidad del TCR. Este receptor les aporta de una potente señal co-estimuladora particularmente en presencia de IL-15. El nivel de expresión de este receptor en LIEs citotóxicos en individuos con EC está incrementado respecto a controles. Además de sobre-expresar NKG2D, estos linfocitos pierden la expresión de receptores inhibitorios como CD94–NKG2A y adquieren también otro receptor estimulador, CD94–NKG2C. A la vez, ocurre inducción

en la expresión de ligandos de estos receptores en la célula epitelial (MIC-A/B y HLA-E), lo que las hace blanco de los linfocitos citotóxicos (Jabri y Sollid, 2009).

Finalmente, es evidente que para que se pueda desencadenar toda la respuesta T CD4⁺ y ocurra un incremento de moléculas como MICA/B y HLA-E en epitelio de manera que los mecanismos citotóxicos operen y culminen en el daño tisular, deben existir disparadores que inicien respuestas del sistema inmune innato. Una posibilidad es el accionar del propio gluten al inducir la expresión de IL-15 y de IFN de tipo I en la mucosa, así como también de moléculas MICA/B en el epitelio. Como mencionamos, existen evidencias experimentales acerca de distintos efectos innatos de péptidos derivados del gluten, pero los mismos son variados y no hay consenso sobre algunos mecanismos propuestos. A su vez, el hecho de que se despierten estos efectos requeriría de un contexto genético adecuado, dado que si se generara en todos los individuos la frecuencia de la enfermedad sería más cercana a la de la portación de los alelos HLA-DQ2/DQ8. Si bien el efecto directo del gluten podría jugar un rol importante, seguramente no sería suficiente para que se desencadene la respuesta adaptativa típica de EC. Por ende, factores disparadores adicionales como infecciones virales o bacterianas podrían ser necesarios (Sollid y Jabri, 2013). En la **Figura 7** se esquematizan los procesos postulados para explicar el daño en la mucosa intestinal de pacientes con EC.

Como consecuencia de los trabajos de investigación de las últimas décadas, y a pesar de la inexistencia de un modelo animal representativo de esta patología, han sido invaluable los avances en el conocimiento de los mecanismos de patogenia en la EC. Sin embargo, varias fases no son aún comprendidas, fundamentalmente las etapas iniciales donde se disparan los mecanismos proinflamatorios y la migración selectiva de células. También faltan esclarecer los estímulos que sostienen la cronicidad, la posible deficiencia en vías de regulación, los mecanismos de daño y remodelación de la mucosa, y el aporte de la susceptibilidad genética por fuera del locus del HLA.

Parte de estas preguntas serán abordadas en este trabajo de Tesis. En particular, estudiaremos algunos genes candidatos, los mecanismos de migración y de muerte celular en la mucosa de intestino delgado. La información obtenida no sólo será de interés en el conocimiento básico de la patología, sino que además podría tener aplicación directa en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes, así como en el desarrollo de nuevas estrategias de intervención terapéutica.

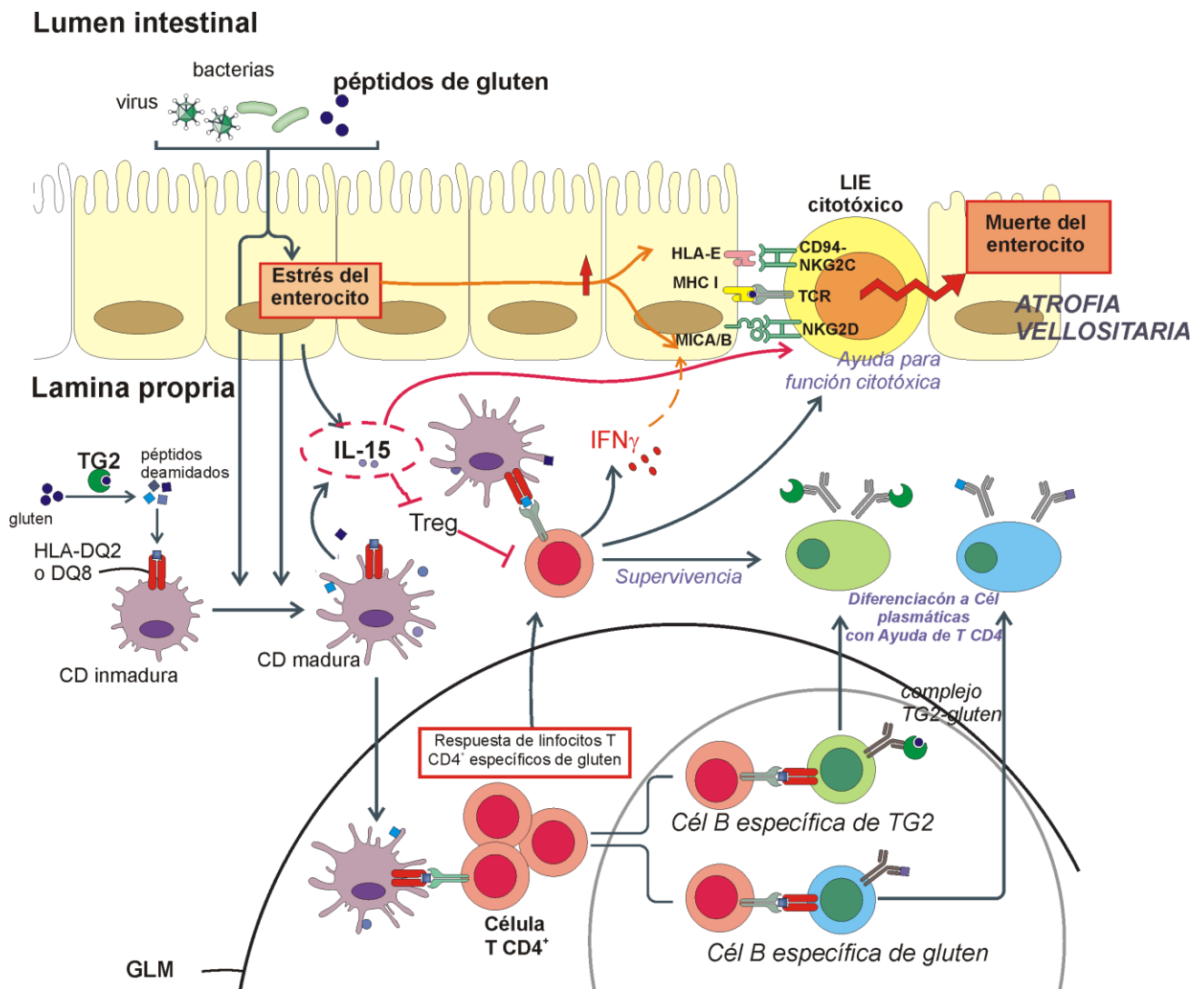


Figura 7. Modelo de inmunopatogenia en EC. Los péptidos derivados del gluten y/o el accionar de virus y bacterias activan vías proinflamatorias en el epitelio, e inducen la expresión de IL-15, MICA y HLA-E. En forma directa o indirecta los péptidos derivados del gluten activan células dendríticas, las que luego migran al ganglio linfático mesentérico (GLM) y presentan péptidos de gluten a linfocitos T CD4⁺ específicos restringidos a HLA-DQ2 o DQ8. La TG2 genera péptidos deamidados de mayor afinidad por estas moléculas del HLA. Los linfocitos T CD4⁺ activados son fuertes secretores de IFN γ y proveen señales de cooperación a linfocitos B específicos de TG2 o de péptidos de gluten y favorecen su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. La presencia de IFN γ favorece el microambiente proinflamatorio y sensibiliza a los enterocitos ante la acción de LIEs citotóxicos. Además los T CD4⁺ activados potencian directamente la actividad citotóxica de LIEs, probablemente a través de la secreción de IL-21 y su acción sinérgica con IL-15 (no mostrado). La IL-15 incrementada inhibiría la acción de células T reguladoras (Treg) favoreciendo la activación de las células Th1. *Modificado de Sollid y Jabri, 2013.*

Objetivo General

Estudiar factores involucrados en los mecanismos de daño en la Enfermedad Celíaca abordando tres ejes principales:

- Selección y evaluación de genes candidatos de susceptibilidad genética a EC, utilizando estrategias posicionales;
- Estudios de mediadores del reclutamiento de poblaciones celulares asociadas al daño en la enteropatía celíaca;
- Análisis de marcadores involucrados en vías de muerte celular en la mucosa intestinal.

Capítulo 1

Búsqueda de marcadores genómicos relevantes en la patogenia de la Enfermedad Celíaca

Los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos en un proyecto ejecutado en colaboración con el Dr. JR Bilbao (Barakaldo, España) y parte de ellos fueron publicados en el artículo: “*THEMIS and PTPRK in celiac intestinal mucosa: coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge*”. Bondar C, Plaza-Lzurietta L, Fernandez-Jimenez N, Irastorza I, Withoff S, CEGEC, Wijmenga C, Chirido F and Bilbao JR. *European Journal of Human Genetics*. (2014) 22, 358–362.

Introducción

La asociación de ciertos alelos del HLA con la enfermedad celíaca es conocida desde comienzos de la década del '70 (Keuning et al., 1976). En la actualidad se sabe que prácticamente toda la población de pacientes con EC expresa las moléculas del HLA referidas en forma genérica como DQ2 o DQ8. No obstante, los alelos que las codifican están presentes en aproximadamente un 30% de la población general, indicando que portarlos no es condición suficiente para desarrollar EC. De hecho, se estima que los alelos de susceptibilidad sólo explican un 35% del riesgo genético. Por lo tanto, es evidente que otros genes deben contribuir a la patogenia de EC (Dubois et al., 2010; Wijmenga y Gutierrez-Achury, 2014).

Existen diferentes tipos de estudios diseñados con el fin de identificar variables genéticas implicadas en la susceptibilidad a enfermedades. Dentro de ellos, los estudios de ligamiento comprenden el análisis genético dentro de grupos familiares con varios individuos afectados por la enfermedad de interés. Su objetivo es dilucidar si los afectados comparten información genética con mayor frecuencia que la esperada por azar en ciertas regiones del genoma, indicando así posibles variantes causantes de la enfermedad. Esta estrategia, si bien es poderosa en casos de enfermedades monogénicas, tiene poco éxito en enfermedades complejas como la EC, donde son muchas las variables individuales y cada una contribuye de manera modesta a la susceptibilidad. Es así que para el año 2000 sólo había sido evidenciado por medio de estos métodos la asociación de un locus (*CD28-CTLA4-ICOS*), más allá del locus del HLA. Con el descubrimiento de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) y el avance de la tecnología que permitió el desarrollo de grandes plataformas de genotipado, se han podido llevar a

cabo estudios amplios de asociación denominados GWAS (*Genome Wide Association Studies*) (Wijmenga y Gutierrez-Achury, 2014).

Los SNPs consisten en variaciones de un nucleótido en posiciones definidas del genoma. Usualmente, estas variaciones sólo se limitan a dos variables alélicas. Se estima que existen 10 millones de SNPs en el genoma humano, con una frecuencia mayor o igual al 1% en la población global. Estas variaciones de un nucleótido pueden ocurrir en segmentos codificantes del genoma y alterar o no el producto codificado (cambio de codón por uno de otro aminoácido, de stop, o del mismo aminoácido). Sin embargo, la mayoría de las variantes de SNPs ocurren en regiones genéticas no codificantes como intrones, zonas de *splicing* o promotores, donde podrían producir alteraciones en la expresión de genes; o en regiones intergénicas, donde su presencia podría ser fenotípicamente desapercibida. Sin embargo, el avance de los estudios de epigenética introduce ahora una nueva perspectiva donde cambios que se consideraban no relacionados con un determinado gen, en realidad pueden afectar su actividad transcripcional. De esta manera, cambios puntuales a nivel del ADN pueden tener aún una más compleja relación con la actividad de un gen en particular.

El estudio de la estructura y naturaleza del genoma permitió establecer que la recombinación genética entre cromosomas paternos y maternos ocurre con diferente frecuencia a lo largo de las distintas regiones, siendo posible definir bloques genómicos donde prácticamente la tasa de recombinación homóloga es nula y son entonces heredados de manera inalterada de generación en generación. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento y los bloques genómicos como haplotipos conservados. Estos haplotipos consisten entonces en combinaciones alélicas definidas para los SNPs que pudieran contener. Todos estos conocimientos tienen un importante valor práctico ya que genotipando unos pocos SNPs elegidos cuidadosamente, es posible inferir el genotipo del resto de los SNPs asociados en esa región. El proyecto HapMap llevado a cabo a nivel mundial tiene como objetivo la descripción de estos haplotipos conservados y los SNPs marcadores o *tag* SNPs, de manera de proveer información para minimizar los loci a genotipar sin perder información relevante en estudios de asociación con enfermedades (International HapMap Consortium, 2003).

En este marco, los GWAS consisten en genotipar miles a millones de SNPs en un conjunto grande de muestras de ADN e identificar aquellas variantes con frecuencias diferenciales entre casos y

controles. Los genotipos de variables no genotipadas directamente en el estudio se infieren a través de la comparación de los SNPs seleccionados con los mapas haplotípicos de referencia, como son los del HapMap. Aquellos SNPs que alcanzan un nivel de significancia en los GWAS usualmente están ubicados dentro de bloques de desequilibrio de ligamiento que contienen varios genes. Estos genes pueden ser entonces considerados como candidatos a estar involucrados en la enfermedad en estudio. Esta estrategia tiene como ventaja que arroja una visión imparcial si se tiene en cuenta que no se parte de información del rol biológico de los genes en cuestión previa al ensayo. Por el contrario, puede resultar difícil definir la o las variantes causantes de la patología partiendo de la mera señal de asociación inicial. Una estrategia que ayuda a identificar genes candidato implica el estudio de asociación entre genotipo y el nivel de expresión de genes aledaños al SNP asociado. Teniendo en cuenta que la expresión de un gen puede estar influenciado por más de un SNP y viceversa, la interpretación de estos resultados es compleja. En conclusión, si bien la identificación de un gen con expresión diferencial asociada a una variante alélica de cierto SNP ayuda a señalarlo para futuros estudios en relación a su rol con la enfermedad, no constituye prueba inequívoca de ese SNP como agente causal de la patología (Trynka et al., 2010; Kumar et al., 2012; Nica y Dermitzakis, 2013).

Al momento se han realizado dos GWAS para EC. El primero, en el año 2007, demostró 13 regiones genómicas asociadas a EC, en adición al ya conocido locus del HLA. Muchos de los genes albergados en estas regiones resultaron ser relacionados a la función inmune (van Heel et al., 2007). Este hecho fue resaltado en el segundo y último GWAS, publicado tres años después, el cual confirmó las asociaciones previamente descritas y sumó 13 regiones más, totalizando así unas 26 regiones genómicas distintas al HLA asociadas a EC (Dubois et al., 2010). El análisis de los distintos candidatos posicionales reveló que las vías de desarrollo de linfocitos T, y ciertas rutas de la respuesta inmune innata estarían causalmente involucradas en la EC. Aproximadamente la mitad de las variantes con asociación a EC en este estudio probaron correlación con cambios en la expresión de genes asociados en sangre periférica. Es interesante resaltar que muchas de las regiones de asociación con EC resultaron estar asociadas también con otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea o diabetes tipo I, mientras que sólo 9 regiones resultaron ser específicas para la EC, incluyendo aquellas del cromosoma 1 conteniendo a *RUNX3* y del cromosoma 6 conteniendo a *THEMIS*, dos genes de nuestro interés (Dubois et al., 2010).

En adición a los dos GWAS realizados en EC, en el año 2011 se desarrolló otro estudio de genotipado masivo, el cual consistió en una plataforma de *arrays* denominada ImmunoChip especialmente diseñada para detectar con mayor resolución regiones asociadas. Para lograrlo, se realizó un genotipado denso en regiones específicamente seleccionadas a partir de los GWAS, incluyendo además de variantes comunes (frecuencia de alelo mayor, $MAF > 5\%$), variantes de baja frecuencia y variantes raras ($0,5\% < MAF < 5\%$ y $MAF < 0,5\%$, respectivamente). Este estudio puso de manifiesto 13 regiones genómicas nuevas asociadas a EC (Trynka et al., 2011), totalizando junto al locus del HLA, 40 regiones asociadas a la enfermedad celíaca. En la **Figura 8** se resumen los tres estudios mencionados.

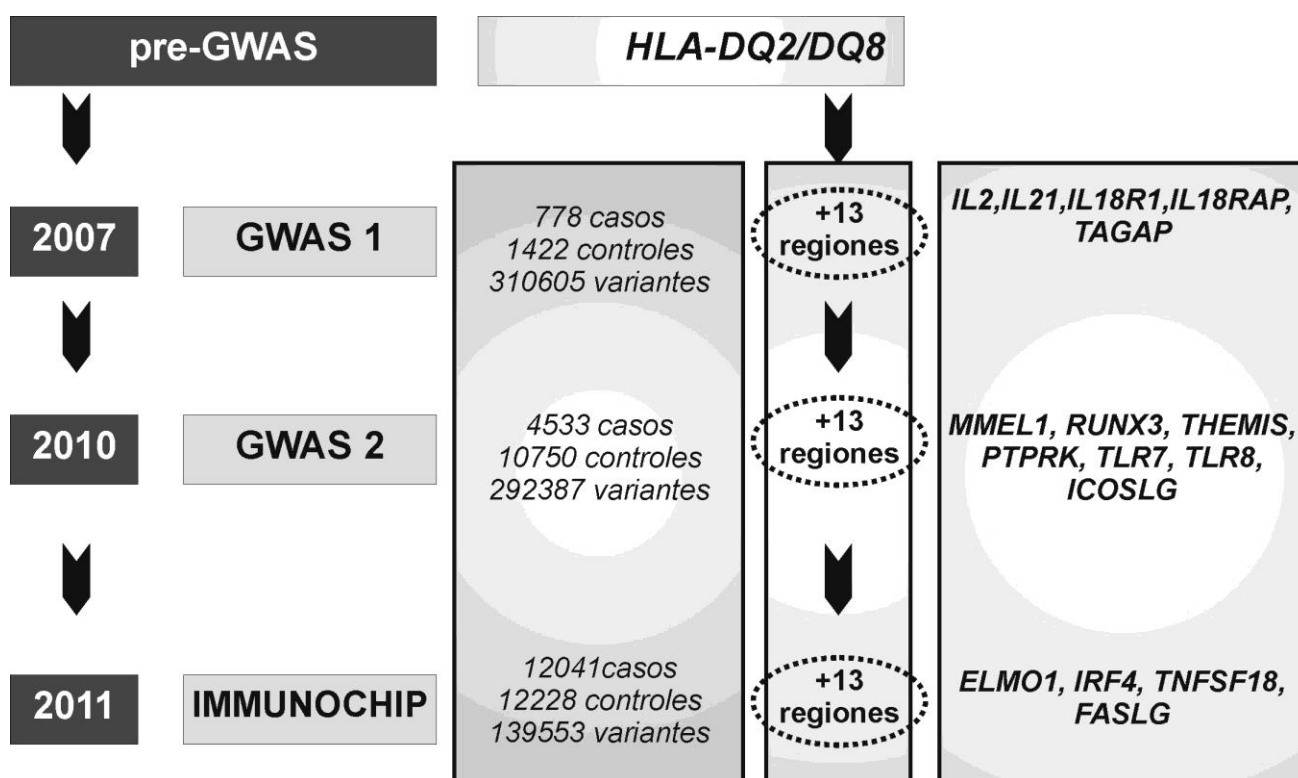


Figura 8. Estudios de asociación genética en EC. Se resumen detalles del protocolo de cada GWAS (Dubois et al., 2010; van Heel et al., 2007) y del ImmunoChip (Trynka et al., 2011); el número de regiones genómicas con asociación significativa a EC descubiertas en cada uno, y algunos de los genes alojados en ellas. *IL2*, *IL21*, *IL18R1* (*IL-18 receptor 1*), *IL18RAP* (*IL-18 receptor accessory protein*), *TAGAP* (*T-cell activation RhoGTPase activating protein*), *MMEL1* (*membrane metallo-endopeptidase-like 1*), *RUNX3* (*runt-related transcription factor 3*), *THEMIS* (*thymocyte-expressed molecule involved in selection*), *PTPRK* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, K*), *TLR7* (*toll-like receptor 7*), *TLR8* (*toll-like receptor 8*), *ICOSLG* (*inducible T-cell co-stimulator ligand*), *ELMO1* (*engulfment and cell motility 1*), *IRF4* (*interferon regulatory factor 4*), *TNFSF18* (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18*), *FASLG* (*Fas ligand*).

En este capítulo, nos enfocaremos en dos de las regiones asociadas con EC señaladas por el segundo GWAS. La región del cromosoma 1 (cr1: 25,11-25,18 Mb HapMap LD Block) donde está alojado *RUNX3*; y la del cromosoma 6 (cr6: 127,99–128,38 Mb HapMap LD Block) donde se encuentran dos genes, *THEMIS* y *PTPRK*.

La señal pico en el GWAS 2010 para la región del cromosoma 1 fue dada por el SNP rs10903122 (a 12 kb 5' de *RUNX3*) y para la región del cromosoma 6 por el SNP rs802734 (11 kb 3' de *PTPRK* y a 39 kb 5' de *THEMIS*). Un año más tarde, el ImmunoChip demostró asociación con EC en esas mismas regiones pero las señales fueron otras: el SNP rs72657048 en la región del cromosoma 1 (localizado dentro de un intrón de *RUNX3*) y en la región del cromosoma 6 reveló un pico principal de asociación que abarca 2 kb (cr6: 128.332-128.335 kb) marcado por rs55743914 (en el 3'-UTR de *PTPRK*) y una señal más amplia secundaria (cr6: 128.307-128.339 kb) marcado por rs72975916 (ubicada en una región intrónica de *PTPRK*), inclinando la balanza a favor de *PTPRK* (Trynka et al., 2011).

Los tres genes centraron nuestro interés por ser candidatos posicionales de susceptibilidad y a su vez por cumplir funciones inmunológicas. *RUNX3* codifica para un factor de transcripción que participa en diversos procesos biológicos tales como hematopoyesis, timopoyesis, maduración de células dendríticas y supresión de tumores gástricos (Grueter et al., 2005; Peng et al., 2006; Kohu et al., 2009). Es importante destacar que este factor de transcripción está involucrado además en la regulación de la expresión de IFN γ (Cruz-Guilloty et al., 2009).

Por otro lado, la expresión de *THEMIS* se encuentra limitada a tejidos linfoides y codifica para una molécula altamente implicada en el desarrollo de linfocitos T, hallándose en mayores niveles de expresión en timocitos que expresan pre-TCR (Lesourne et al., 2009). Aunque su expresión no es tan marcada en linfocitos T diferenciados (Fu et al., 2009), se ha sugerido que *THEMIS* cumple también una función importante en la señalización del receptor T (Brockmeyer et al., 2011).

Entre las funciones de *PTPRK* se destacan aquellas relacionadas con el mantenimiento de la unión intercelular (Sap et al., 1994; Schnekenburger et al., 2005; Anders et al., 2006) y con la modulación de la actividad del EGFR que resulta en una inhibición de la proliferación celular (Xu et al., 2006, 2010). Además, es interesante resaltar que *THEMIS* y *PTPRK* han sido reportados en su conjunto

como esenciales para el normal desarrollo de linfocitos T CD4⁺ en roedores (Iwata et al., 2010), lo que sugiere que ambos genes pueden participar en procesos biológicos en forma conjunta.

Objetivos Específicos

En primer lugar, dada la importancia de replicar los resultados de asociación, nuestro objetivo fue determinar la asociación alélica para las regiones que contienen a *RUNX3* y a *THEMIS/PTPRK*, en una población determinada (población Española). En una instancia posterior, a raíz de los resultados del ImmunoChip, nos propusimos el análisis independiente de los marcadores estudiados en dicha plataforma, avocándonos a la misma población y limitándonos a las dos regiones de interés, con el fin de disminuir efectos dilutorios y poder evaluar las señales de asociación con EC dentro de una población particular.

De forma paralela, nos propusimos realizar estudios funcionales sobre los tres genes con asociación general a EC seleccionados: *RUNX3*, *THEMIS* y *PTPRK*. Para esto, se propuso evaluar los niveles de expresión de ambos genes en biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico, los mismos pacientes luego de al menos dos años en DLG, y de controles no celíacos. También, con el fin de dilucidar posibles efectos moduladores sobre la expresión de alguno de estos genes candidato, trabajar con biopsias duodenales de pacientes en DLG o células de una línea celular de enterocitos incubadas en presencia o ausencia de gliadina.

Finalmente, nos propusimos determinar si las variantes asociadas a EC tienen alguna influencia en la expresión del gen aledaño. Para esto serán considerados los genotipos de los SNPs más importantes del GWAS y del ImmunoChip (rs10903122 y rs72657048 en la región del cromosoma 1 y rs802734, rs55743914 y rs72975916 en la región del cromosoma 6, respectivamente), así como también aquellos que resulten más fuertemente asociados en la población local española.

Materiales y Métodos

Pacientes y muestras

Los pacientes celíacos incluidos en este trabajo fueron diagnosticados bajo los criterios de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición en la Unidad de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Cruces, Barakaldo, País Vasco, España. Para los análisis de expresión génica, se obtuvieron por paciente dos piezas de biopsias de la porción distal del duodeno: una biopsia al momento del diagnóstico, y la otra durante estudios de rutina luego de dos años de adherencia a la dieta libre de gluten (con serología e histología normalizadas y remisión de síntomas). Fueron incluidos en este estudio un total de 36 pacientes celíacos (22 niñas y 14 niños; edad al diagnóstico 2,48 \pm 1,19 años). Además fueron incluidas biopsias correspondientes a 12 individuos no celíacos como controles.

Para los estudios de estimulación *in vitro*, se obtuvieron dos biopsias duodenales de 8 pacientes celíacos en dieta (luego de dos años de tratamiento, como se indicó anteriormente). Las biopsias fueron incubadas inmediatamente en RPMI solo o con 250 μ g/ml de gliadina digerida con pepsina y tripsina. Las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas.

Todas las muestras de tejido fueron conservadas en nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN.

A partir de sangre periférica de los mismos pacientes donadores de biopsias se realizó una extracción de ADN utilizando NucleoSpin Blood Kit (Machery Nagel). El mismo fue utilizado para los ensayos de genotipado.

El estudio fue aprobado por el Consejo de Ética del Hospital de Cruces. Todas las muestras fueron recolectadas bajo consentimiento informado de los padres de los pacientes.

Digestión de gliadinas y BSA

Se disolvieron 500 mg de gliadinas (Sigma-Aldrich, cat G3375) en 5 ml 0,2 M de HCl y se incubaron con 5 mg de pepsina (Sigma-Aldrich, cat P6887) en agitación continua a 37°C durante dos horas. Luego se ajustó el pH en 7,4 con NaOH y la mezcla se incubó con 5 mg de tripsina (Sigma-Aldrich, cat T9201) durante 4 horas a 37°C. Finalmente, el digesto se calentó en baño de agua hirviendo

por 30 minutos con el fin de inactivar las enzimas y se centrifugó a 2000 g por 10 minutos. El sobrenadante se esterilizó por filtración. La proteína fue cuantificada por el método de ácido bicinconínico (BCA). Esta preparación constituye la fracción denominada PT-gliadina. La digestión de BSA se realizó de manera análoga.

Análisis de expresión génica

Las biopsias congeladas se disgregaron en 300 µl de buffer de lisis y fueron homogeneizadas en columnas QIAshredder (Qiagen). El ARN total se aisló utilizando un kit comercial (RNeasy Micro Kit, Qiagen) con ADNasa I. El ARN aislado fue conservado a -80°C hasta su utilización. Su cuantificación y control de calidad se realizó por métodos espectrofotométricos convencionales.

La expresión de *RUNX3*, *THEMIS* y de *PTPRK* fue cuantificada mediante transcripción reversa y PCR en tiempo real en un solo paso de reacción a partir de 8 ng de ARN total. Para esto se utilizó una mezcla enzimática comercial (QuantiTect Probe RT-PCR Kit, Qiagen) y sondas comerciales específicas para cada gen (Applied Biosystems). Las medidas se realizaron por triplicado en un equipo ABI7900HT. La determinación del gen *housekeeping RPLP0* fue realizada en simultáneo como control endógeno de la cantidad presente de ARN en cada fosa. La expresión relativa en cada muestra se calculó por el método “delta CT” (Ginzinger, 2002).

Selección de SNP, ensayos de genotipado y análisis de asociación

En el estudio de asociación, se determinaron los genotipos de 532 controles y 517 celíacos para rs1093122 y de 524 controles y 538 celíacos para rs802734, SNPs correspondientes a las señales de asociación publicadas por el GWAS en los bloques de desequilibrio de ligamiento que alojan los genes *RUNX3* y *THEMIS/PTPRK*, respectivamente. Se trabajó con ADN extraído a partir de sangre periférica de pacientes pediátricos celíacos y controles no celíacos del Hospital de Cruces. Se utilizaron sondas comerciales, como se describe a continuación.

Con el fin de identificar señales específicas dentro de la población española, los resultados del ImmunoChip correspondientes al set de muestras aportadas por el CEGEC (Consortio Español para la Genética de la Enfermedad Celíaca) fueron analizados en forma independiente utilizando el software PLINK v.1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) (Purcell et al., 2007). Se

contemplaron únicamente las variables analizadas dentro de la región de interés del cromosoma 1 (25.080 - 25.180 Kb) y del cromosoma 6 (128.000 - 128.400 Kb). Este set de muestras comprende 545 celíacos y 308 controles. Para confirmar la existencia de desequilibrio de ligamiento entre variables de interés en la población de estudio, se empleó el software HaploView (Barrett et al., 2005).

En referencia al análisis de la influencia del genotipo sobre el nivel de expresión génica, los SNPs de mayor asociación publicados por GWAS y por Immunochip a nivel general, y aquellos resultantes del análisis individual correspondiente a las muestras aportadas por CEGEC, fueron genotipados en muestras de pacientes y controles. Para esto fueron utilizadas sondas comerciales de discriminación alélica TaqMan para los siguientes SNPs: rs10903122, rs802734, rs72975916, rs10484718 y rs9491896. Para el SNP rs55743914 el ensayo fue diseñado utilizando el software Primer Express (forward primer: 5'-ACCCACAGATATCTCTCGTTAGAAGTAA-3', reverse primer: 5'-GGCTCGTAAAGTCAGAACATAGCTT-3', sondas: 5'-FAM-TCTGCATACAGTTTCACCTA-MGB-3' y 5'-VIC-CATACAGCTTACCTAGA-MGB-3'). Lo mismo ocurrió para rs2236852 (forward primer: 5'-CCACCCAGAGCCCAACTG-3', reverse primer: 5'-CAGGTATCAAGTCTCCATTGAAGGA-3', sondas: 5'-FAM-CCCCTGGAGACGTA-MGB-3' y 5'-VIC-CCCCTGGAGACATA-MGB-3').

Las reacciones fueron realizadas en un equipo 7900HT (Applied Biosystems). Para determinar los posibles efectos de estas variantes alélicas sobre sitios de unión a factores de transcripción o a microRNAs, o sobre sitios de *splicing* alternativo se utilizaron las herramientas bioinformáticas PupaSuite (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>) (Conde et al., 2006) y Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) (Ward y Kellis, 2012).

Cultivo Celular

La línea celular humana de enterocitos T84 fue cultivada en medio de cultivo DMEM suplementado con suero y antibióticos en placas de 24 fosas hasta confluencia. Las fosas fueron entonces incubadas en presencia de PT- Gliadina 250 µg/ml, PT-BSA 250 µg/ml o sólo medio. Se realizaron estímulos a 6 y 24 horas, luego de lo cual, las células fueron colectadas para la extracción de ARN, como se describió anteriormente.

Análisis estadísticos y de correlación

Los análisis de asociación génica para los SNPs rs802734 y rs1093122 genotipados sobre las muestras del Hospital de Cruces se analizaron mediante un test de chi cuadrado utilizando el software GraphPad Prism v.5.0. Los valores de Odds Ratio (OR) e intervalos de confianza (IC) fueron calculados con el mismo programa de análisis.

Los niveles de expresión génica de pacientes celíacos al diagnóstico y luego de dos años de DLG fueron comparados con un test T pareado. La comparación entre los niveles de expresión en celíacos al diagnóstico o en dieta y controles se realizó con un test T no pareado. El mismo test se utilizó para comparar niveles de expresión entre grupos de pacientes según su genotipo en los diferentes SNPs.

Por otro lado, la existencia de correlación entre los niveles de expresión de cada gen en biopsias y de los valores de cambio relativo, se analizó usando el test de correlación de Pearson. Los niveles de inducción de expresión génica en células o en biopsias se refirieron al basal y se analizaron mediante un test T para muestra única. Todos estos análisis se realizaron con el software GraphPad Prism v.5.0. Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Estudio de asociación alélica evaluando SNPs descritos en el GWAS

En un set de muestras de ADN pertenecientes a un grupo de más de 500 controles y más de 500 celíacos, fueron determinados los genotipos para dos SNPs asociados a EC señalados por el GWAS 2010. Para la región de interés dentro del cromosoma 1 (cr1: 25,11-25,18 Mb) se evaluó al SNP rs1093122 y para la región de interés comprendida en el cromosoma 6 (cr6: 127,99–128,38 Mb) a rs802734. Estos bloques alojan respectivamente a los genes candidato *RUNX3* y a *THEMIS* y *PTPRK*.

Para cada SNP, el genotipado se realizó mediante PCR obteniéndose el número de individuos homocigotas para cada uno de los dos alelos en cuestión y el número de heterocigotas. Realizando un test de chi cuadrado sobre estos datos, observamos que ninguna de las dos variantes presentó asociación genotípica con EC en la población estudiada (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de genotipos para las variantes rs1093122 y rs802734.

DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS					
	<i>RUNX3</i>		<i>THEMIS/PTPRK</i>		
rs1093122	controles	celíacos	rs802734	controles	celíacos
AA	128	112	AA	257	240
AG	268	257	AG	216	238
GG	136	148	GG	51	60
TOTAL	532	517	TOTAL	524	538

Se muestran los resultados obtenidos sobre muestras de 532 controles y 517 celíacos para rs1093122, y de 524 controles y 538 celíacos para rs802734. Análisis de asociación genotípica (test chi-cuadrado) no significativa; $p=0,452$ (rs1093122) y $p=0,334$ (rs802734).

Para estudiar la asociación alélica se comparó, en cada SNP, la presencia de cada alelo en celíacos y en controles. Se contempló dos veces el número de homocigotas y uno el de heterocigotas para calcular la presencia total de cada alelo en cada grupo. Estos datos se

analizaron en una tabla de doble entrada mediante un test chi cuadrado. Llamativamente, los resultados no replicaron los observados en el GWAS. Es decir, las variantes estudiadas dentro de la población española evaluada, no presentaron asociación alélica significativa con EC. En la **Tabla 5** pueden observarse los resultados obtenidos. Se entiende por frecuencia alélica a la proporción en que cierto alelo es observado respecto al conjunto de alelos que pueden ocupar ese locus (en estos casos, sólo dos alelos posibles: A o G) por lo que, para cada SNP, las frecuencias de cada alelo suman 1. Se detallan para cada SNP el alelo menor (el de menor frecuencia), la frecuencia del alelo menor (MAF) en casos y en controles, y también los parámetros resultantes del test estadístico. Como se observa, los valores de p muestran que no hay significancia estadística en ninguno de los dos casos. Los valores de *Odds Ratio* (OR) en estos estudios nos indican la razón entre la probabilidad de que haya enfermedad portando el alelo menor respecto de la probabilidad de que ocurra sin portarlo. Con lo cual, evaluando los valores de OR obtenidos, podemos suponer una tendencia del alelo menor para rs1093122 (A) a ser protector ($OR < 1$) y una tendencia del alelo menor para rs802734 (G) a ser el alelo de riesgo ($OR > 1$). Sin embargo, como se mencionó, estas tendencias no son significativas, puesto aún más de manifiesto por el solapamiento del intervalo de confianza del OR con el valor de efecto nulo ($OR = 1$). Estas tendencias son congruentes con lo observado en el GWAS a nivel de la población global (rs10903122 $OR = 0,89$ IC: 0,85-0,92; rs802734 $OR = 1,17$ IC: 1,12-1,22) (Dubois et al., 2010).

Tabla 5. Estudio de asociación alélica.

Gen	SNP	AM	MAF Casos	MAF Controles	p	OR	IC
<i>RUNX3</i>	rs1093122	A	0,47	0,49	0,211	0,896	0,755-1,064
<i>THEMIS/PTPRK</i>	rs802734	G	0,33	0,30	0,148	1,145	0,953-1,374

Se detallan los valores de p (test chi-cuadrado), odds ratio (OR) calculado en referencia al alelo menor, y del intervalo de confianza (CI). AM: alelo menor; MAF: frecuencia de alelo menor.

Estudios de expresión de ARNm de *RUNX3*, *THEMIS* y *PTPRK* en duodeno

Los análisis de expresión génica por PCR cuantitativa revelaron para *RUNX3* un nivel significativamente mayor en mucosa intestinal de pacientes con EC activa respecto a los mismos pacientes luego de dos años en DLG, y respecto a controles (**Figura 9a**).

Por otro lado, los análisis de expresión para los genes ubicados en nuestra región de interés del cromosoma 6, mostraron una mayor expresión de *THEMIS* en pacientes celíacos al diagnóstico comparado con los mismos pacientes luego de dos años de DLG y también respecto a individuos controles (Figura 9b). Por el contrario, lo niveles de ARNm de *PTPRK* resultaron significativamente inferiores en pacientes con EC activa respecto a individuos tratados. La comparación de la expresión de *PTPRK* entre celíacos al diagnóstico y controles no mostró significancia estadística pero este último grupo presentó una tendencia comparable a la observada en el grupo tratado (Figura 9c).

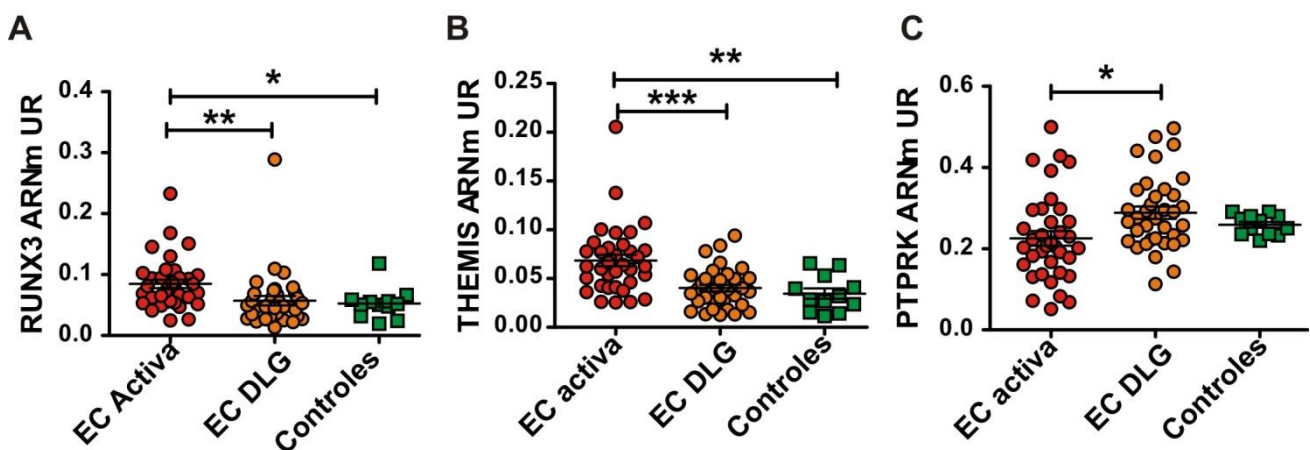


Figura 9. Expresión de *RUNX3*, *THEMIS* y *PTPRK* en mucosa duodenal. La expresión relativa de *RUNX3* (A), *THEMIS* (B) y *PTPRK* (C) fue determinada por PCR cuantitativa en pacientes celíacos al momento del diagnóstico (n=36), en los mismos pacientes luego de dos años de tratamiento y en controles no celíacos (n=12). Niveles referidos a β -actina; unidades relativas (UR). Comparación entre pacientes al diagnóstico y tratados: test T pareado; comparación con controles: test T no pareado. *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001.

Selección de SNPs y evaluación de la influencia del genotipo en los niveles de expresión

Una vez conocidos los resultados del análisis realizado en el Immunochip, decidimos evaluar de manera independiente los resultados de las muestras pertenecientes a la población española incluidas en dicha plataforma (específicamente aquellas aportadas por el CEGEC).

El análisis se realizó entonces mediante el software PLINK contemplando únicamente los genotipos de los 545 celíacos y 308 controles españoles sobre aquellas variables incluidas en la plataforma que estuvieran comprendidas en las regiones de nuestro interés del cromosoma 1 (25.080 - 25.180 Kb) o del cromosoma 6 (128.000 - 128.400 Kb).

Dentro de la región del cromosoma 1, el estudio señaló que los SNPs destacados en el último GWAS (rs10903122) y en el ImmunoChip (rs72657048) no presentaron asociación con EC en esta población. Sin embargo, fue posible observar una señal de asociación nominal clara dada por la variante rs2236852 (variante intrónica sobre *RUNX3*) y en menor medida por el SNP rs12408466 (Figura 10 y Tabla 6).

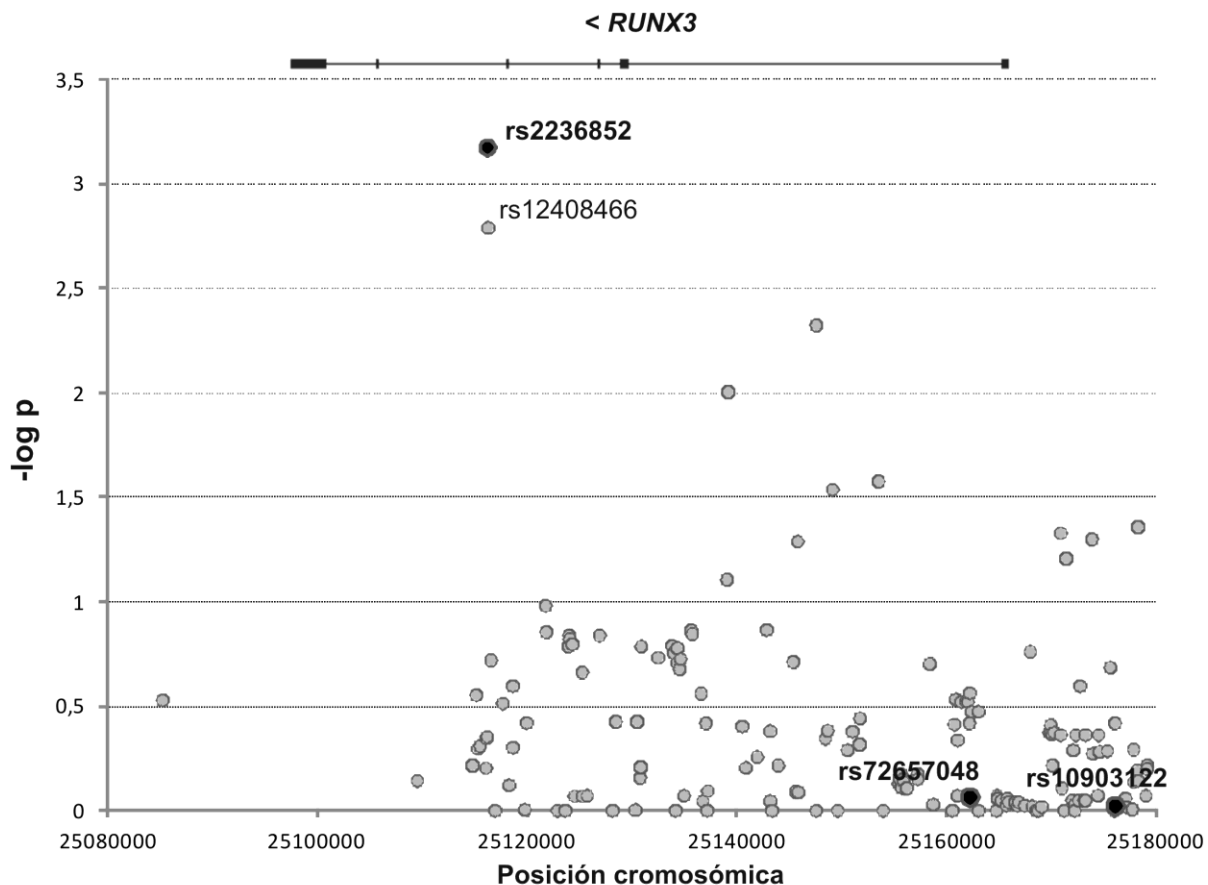


Figura 10. Resultados del análisis de asociación para los SNPs testeados en el ImmunoChip sobre las muestras CEGEC, dentro de la región genómica que aloja a *RUNX3* (cr1: 25.080-25.180 Kb) (Hg18). Se muestra la distribución de SNPs según su posición y los valores del negativo del logaritmo de los valores de p nominales en cada caso (-log p). Se resaltan aquellos SNPs que mostraron mayor asociación con EC en el GWAS y en el ImmunoChip (resultados globales), rs10903122 y rs72657048; respectivamente, y la variante con menor p nominal en este análisis, rs2236852. Cercana a esta se observó otra variante, rs12408466, también con un bajo valor de p nominal.

Tabla 6. Análisis de asociación en cr1: 25.080-25.180 Kb.

SNP	Posición	AM		MAF Casos	MAF Controles	p
rs12408466	25116262	A	C	0,3977	0,4741	0,001622
rs2236852	25116354	G	A	0,4322	0,5147	0,0006774
rs72657048	25162321	C	G	0,4867	0,4906	0,8696
rs10903122	25176163	A	G	0,4785	0,4773	0,9602

Se detallan para cada SNP su posición (Hg18), su alelo menor (AM), frecuencia del alelo menor (MAF) en casos y controles y los valores de p nominal obtenidos a partir del análisis de las muestras aportadas por CEGEC al ImmunoChip. Las variables rs12408466 y rs2236852 señalan la asociación nominal de la región con EC en esta población y se encuentran en desequilibrio de ligamiento ($r^2=0,86$). Las variables rs72657048 y rs10903122 son aquellas que señalaron la asociación en el ImmunoChip y el GWAS 2010 respectivamente y también se encuentran entre sí en desequilibrio de ligamiento.

Ante estos resultados, distintos SNPs fueron seleccionados para determinar si las posibles variantes genóticas influyen en la expresión de *RUNX3* a nivel del intestino delgado. Para realizar este estudio fue necesario genotipar muestras de ADN (obtenida a partir de sangre periférica) pertenecientes a pacientes cuyas biopsias habían sido sujetas previamente a análisis de expresión génica. Como ayuda en la selección, evaluamos los bloques de desequilibrio de ligamiento en esta población mediante el software HaploView. Esto nos permite, en líneas generales, discriminar si ciertas variantes son heredadas en forma conjunta y evitar así genotipar ambas. Observamos que los dos SNPs de menor p nominal en nuestra población (rs12408466 y rs2236852) se encuentran en desequilibrio de ligamiento ($r^2=0,86$), por lo que sólo fue genotipado rs2236852. Además fue de nuestro interés incluir las variantes señaladas por el GWAS y por el ImmunoChip, de las cuales, por estar en desequilibrio de ligamiento ($r^2=0,92$), sólo fue genotipada rs10903122.

Una vez obtenidos los genotipos de los pacientes para rs10903122 y rs2236852, los datos fueron cruzados con los de expresión. Los distintos genotipos hallados no mostraron tener influencias sobre el nivel de expresión de ARNm de *RUNX3* (Figura 11).

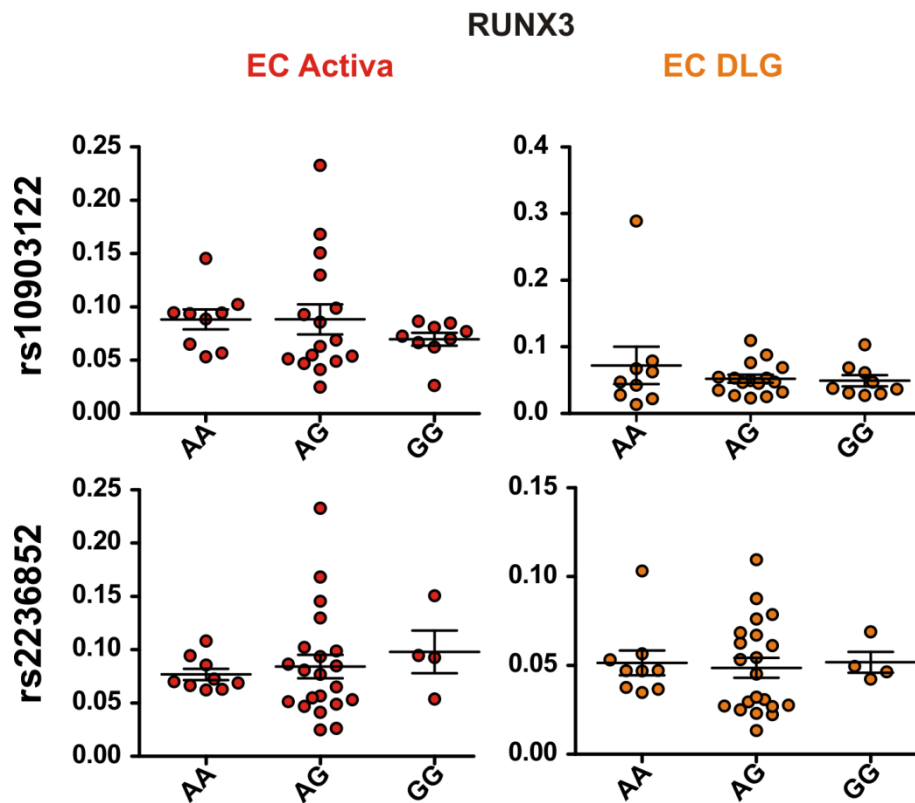


Figura 11. Niveles de expresión de ARNm de *RUNX3* según los genotipos de los SNPs analizados. Se muestran en rojo los pacientes celíacos al diagnóstico y en naranja pacientes celíacos en DLG (n=36). Test T no pareado; no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Análogamente a lo realizado en el cromosoma 1, procedimos a analizar nuestra región de interés en el cromosoma 6. El estudio de asociación sobre las variables genotipadas en el Immunochip, reveló en nuestra población de estudio que los SNPs señalados por el último GWAS (rs802734) y por el mismo Immunochip (rs55743914 y rs72975916) no presentan asociación con EC. En cambio, se evidenciaron otros SNPs que demuestran la asociación nominal en la región (**Figura 12 y Tabla 7**).

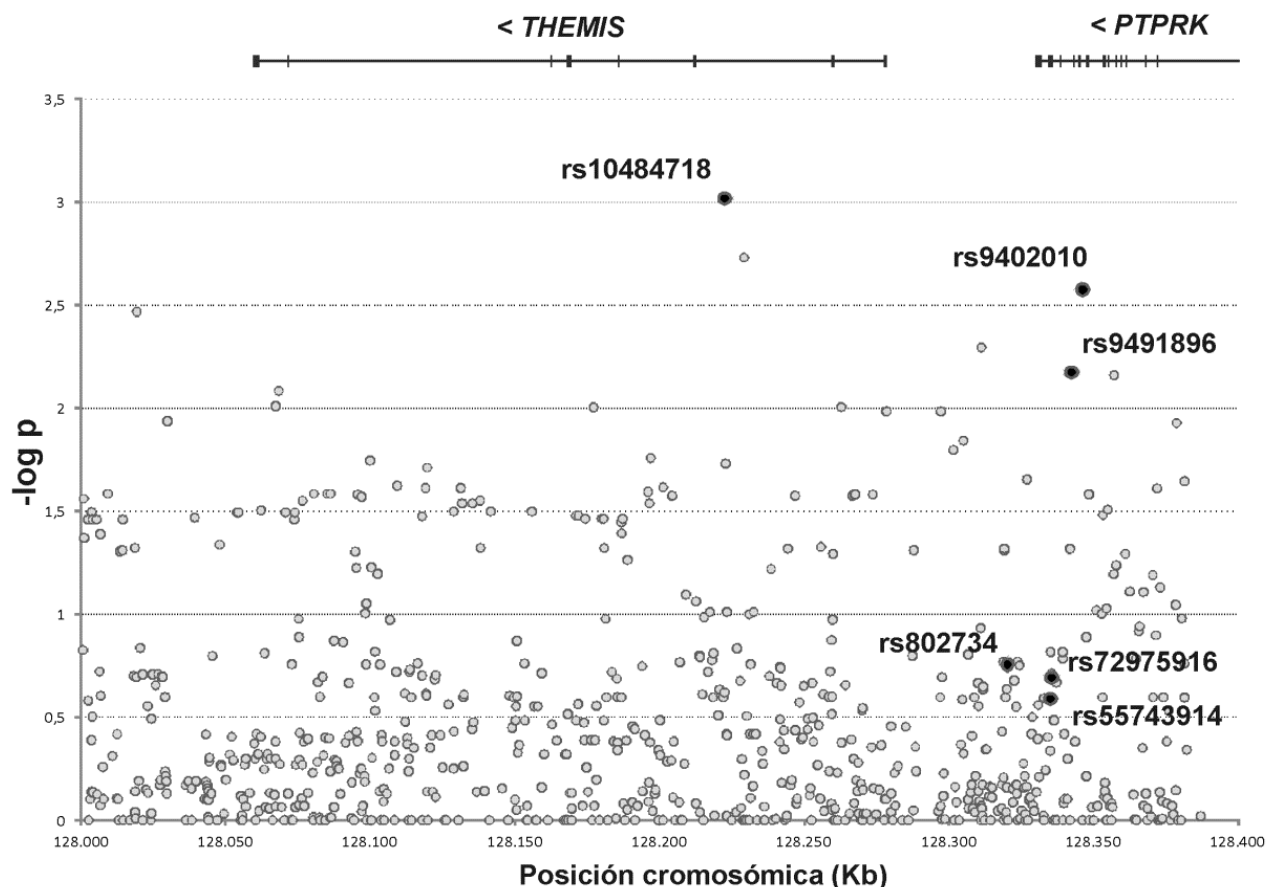


Figura 12. Resultados del análisis de asociación para los SNPs testeados en el ImmunoChip sobre las muestras CEGEC, dentro de la región genómica que aloja a *THEMIS* y *PTPRK* (cr6: 128.000-128.400 Kb) (Hg18). Se muestra la distribución de SNPs según su posición y los valores del negativo del logaritmo de los valores de p nominales en cada caso (-log p). Se resaltan aquellos SNPs que mostraron mayor asociación con EC en el GWAS y en el ImmunoChip (resultados globales), rs802734, y rs72975916 y rs55743914 respectivamente; y las variantes con menor p nominal en este análisis, rs10484718, rs9402010 y rs9491896.

Tabla 7. Análisis de asociación en cr6: 128.000-128.400 Kb.

SNP	Posición	AM		MAF Casos	MAF Controles	p
rs10484718	128222744	A	T	0,07377	0,1206	0,0009616
rs802734	128320491	G	A	0,3176	0,2874	0,177
rs55743914	128335255	A	G	0,2756	0,2513	0,2577
rs572975916	128335748	A	G	0,09119	0,1096	0,2043
rs9491896	128342642	A	G	0,09016	0,131	0,006734
rs9402010	128346506	C	A	0,08504	0,1297	0,002665

Se detallan para cada SNP su posición (Hg18), su alelo menor (AM), frecuencia del alelo menor (MAF) en casos y controles y los valores de p nominal obtenidos a partir del análisis de las muestras aportadas por CEGEC al ImmunoChip. La variable rs10484718 en *THEMIS* y las variables rs9491896 y rs9402010 en *PTPRK* señalan la asociación nominal de la región con EC en esta población. Las variables rs55743914 junto con rs572975916, y la variable rs802734, son aquellas que señalaron la asociación en el ImmunoChip y el GWAS 2010, respectivamente.

Para estudiar una posible influencia del genotipo sobre el nivel de expresión de *THEMIS* y de *PTPRK*, seleccionamos algunos de estos SNPs. Entre ellos, los dos SNPs de menor valor de p nominal dentro de cada gen de interés: rs10484718 en *THEMIS* y rs9491896 en *PTPRK* (ambas variables intrónicas). En el caso de *PTPRK*, el SNP seleccionado se encuentra en desequilibrio de ligamiento con rs9402010 ($r^2=0,96$), de menor p nominal. Esto permitió genotipar rs9491896 en lugar de rs9402010 sin perder información, dado que para este último no fue posible diseñar un ensayo. En este análisis fueron genotipados también los SNPs más importantes del GWAS y del Immunochip en la región (rs802734, rs55743914, rs72975916, rs10484718 y rs9491896). Como se explicó anteriormente, se genotiparon muestras de ADN obtenidas a partir de sangre periférica de pacientes cuyas biopsias duodenales habían sido evaluadas en los ensayos de expresión. Al comparar genotipos con niveles de expresión de ARNm observamos que ninguno de los SNPs analizados mostró afectar la expresión de *PTPRK*. Para el caso de *THEMIS*, solamente el alelo de riesgo rs802734*G (identificado en el GWAS) se asoció con una mayor expresión del gen en pacientes homocigotas en dieta libre de gluten (**Figura 13**).

Finalmente, es interesante destacar que mediante el uso de herramientas bioinformáticas (PupaSuite, ENCODE DATA), se investigó si algunos de las variantes alélicas de los SNPs estudiados en ambas regiones de interés generaban modificaciones que pudieran alterar de manera relativamente directa la expresión de un gen (sitios de unión de factores de transcripción o microRNA, splicing alternativo, etc.), pero los resultados fueron negativos.

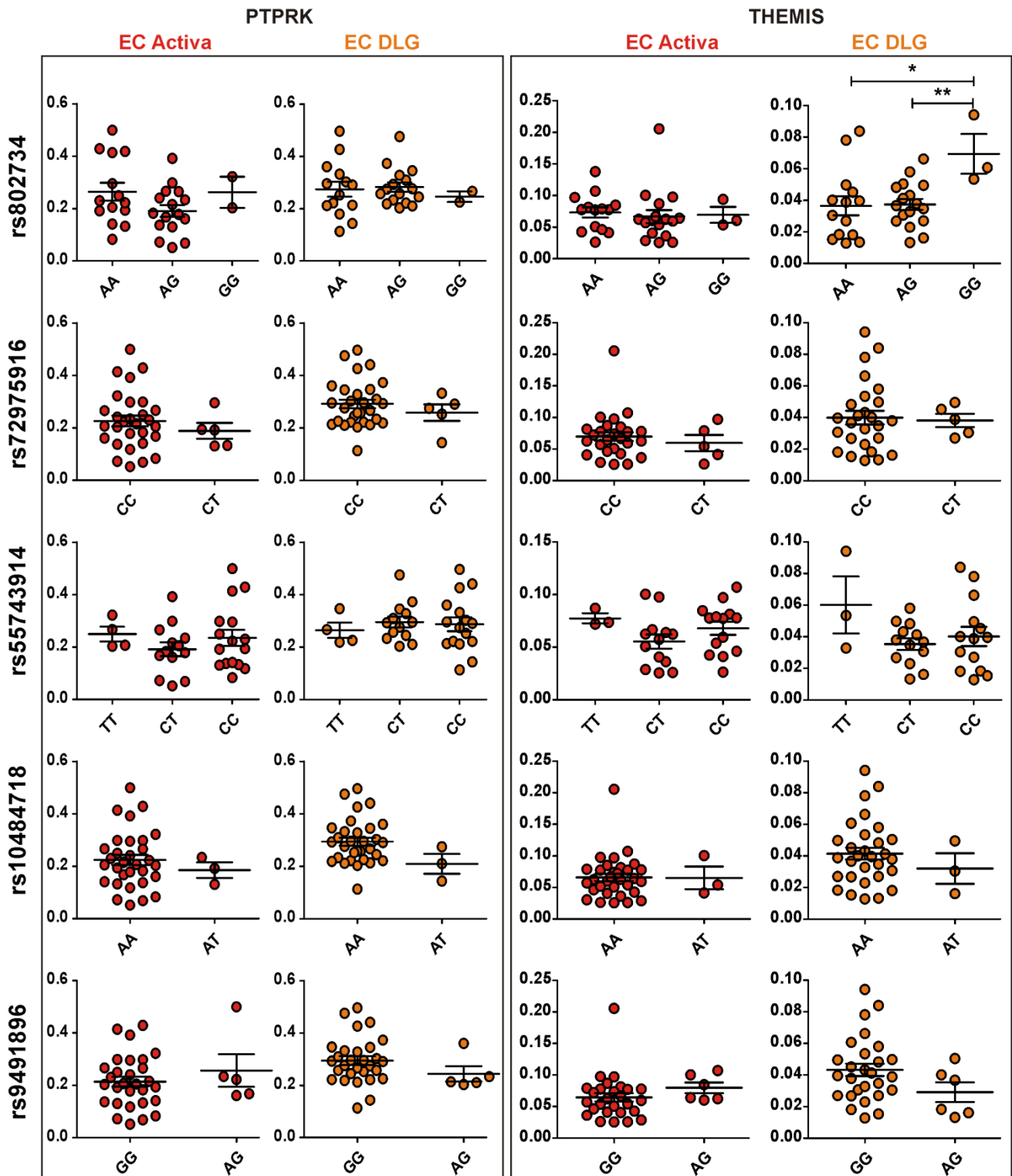


Figura 13. Niveles de expresión de ARNm de *PTPRK* y *THEMIS* según los genotipos de los SNPs analizados. Se muestran en rojo los pacientes celíacos al diagnóstico y en naranja pacientes celíacos en DLG (n=36). Test T no pareado; *p<0,05 **p<0,01.

Análisis de co-expresión de *THEMIS* y *PTPRK* en duodeno

Dada la asociación genética descrita para *THEMIS* y *PTPRK* nos interesó evaluar si estos dos genes podrían estar funcionalmente vinculados, con respecto a la modulación de su expresión. Es así que, evaluando el patrón de expresión a nivel de ARNm de *THEMIS* y *PTPRK*, observamos llamativamente una correlación significativa entre la expresión de ambos genes en el grupo de pacientes con EC, tanto al momento del diagnóstico como luego de dos años en DLG. Lo interesante de este resultado es que dicha correlación no se observó en el grupo control (**Figura 14**). Además, el mismo análisis comparando valores de cambio relativo en los niveles de expresión inducidos por la enfermedad activa (niveles en EC activa/niveles en EC tratada), reveló que la tendencia de cambio en ambos genes es la misma (**Figura 15**).

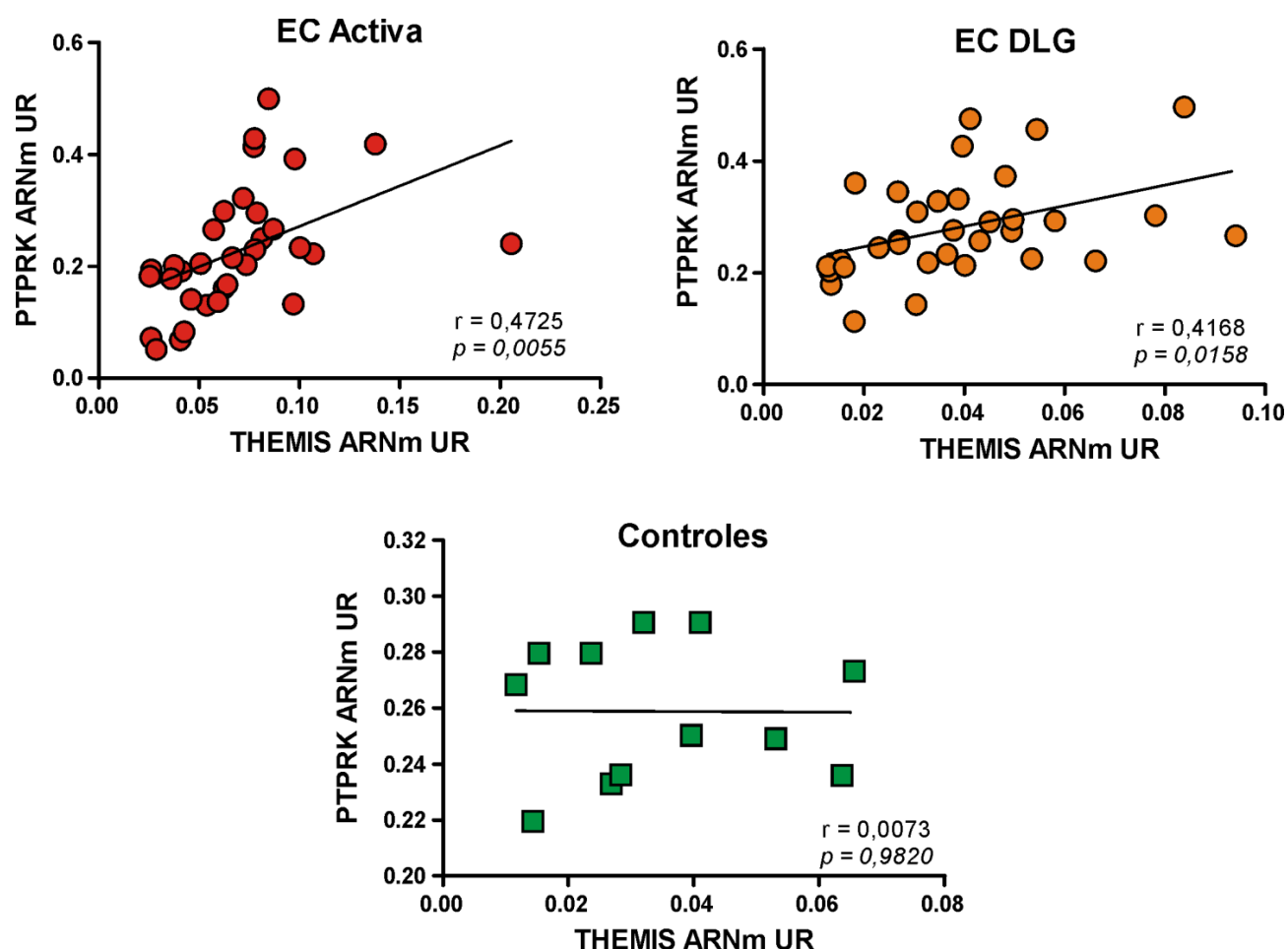


Figura 14. Correlación en la expresión de *THEMIS* y *PTPRK* en mucosa duodenal de pacientes celíacos. Correlación entre la expresión de ARNm de *PTPRK* y *THEMIS* ARNm en pacientes celíacos al diagnóstico, pacientes en DLG (n=36) y en controles (n=12). Se muestran los valores del coeficiente de Pearson r y de p para la regresión lineal.

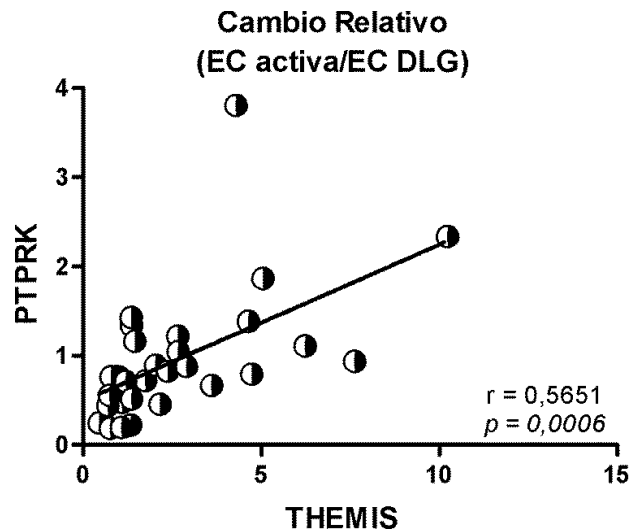


Figura 15. Correlación entre los valores de cambio relativo en la expresión de THEMIS y de PTPRK (EC activa/EC en DLG). Se muestran los valores del coeficiente de Pearson r y de p para la regresión lineal.

Ante estos resultados y con el objetivo de evaluar posibles incidencias de la ingesta de gluten sobre la expresión de alguno de estos dos genes candidatos, se realizaron estudios de inducción *in vitro* incubando dos biopsias duodenales pertenecientes a pacientes con EC en DLG durante 4 horas: una en presencia de medio solo, y otra en presencia de gliadinas digeridas con pepsina y tripsina (PT-Gliadina). Si bien ninguno de los dos genes mostró cambios significativos en su expresión ante la presencia de gliadinas, la tendencia de cambio en ambos genes mostró nuevamente una correlación significativa (Figura 16).

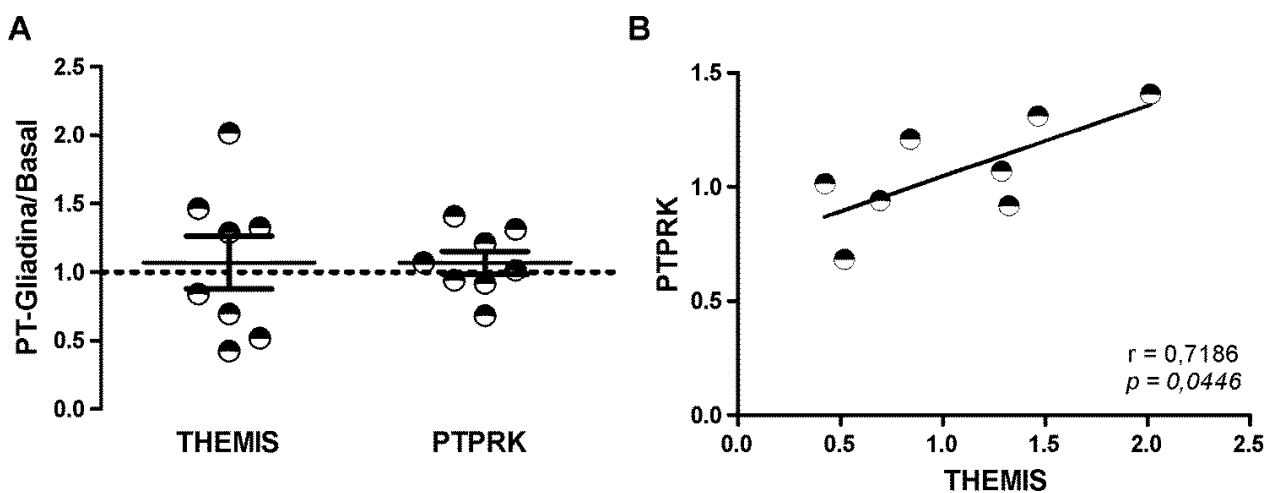


Figura 16. Efecto de PT-gliadina sobre la expresión de THEMIS y PTPRK. Se incubaron biopsias duodenales de pacientes celíacos en DLG (n=8) en presencia de PT-Gliadina durante 4 horas. Los niveles de expresión de ARNm de cada gen se determinaron por PCR cuantitativa y se expresan como la relación de expresión en presencia de gliadinas sobre la expresión basal sin estímulo (A). Test T para muestra única, diferencias estadísticamente no significativas. Se muestra también la correlación entre la tendencia de cambios en ambos genes en esta misma situación (B). Se muestran los valores del coeficiente de Pearson r y de p para la regresión lineal.

Análisis de la expresión de *THEMIS*, *PTPRK* y *RUNX3* en la línea celular T84

Dado los resultados obtenidos en piezas de biopsias de intestino delgado, decidimos investigar el efecto de péptidos derivados de gliadinas en la expresión génica de *THEMIS*, *PTPRK* y *RUNX3* utilizando una línea celular modelo de enterocito humano. Para esto se realizaron incubaciones durante 6 y 24 horas de células T84 en presencia de PT-Gliadina, PT-BSA como proteína control, o de medio solo. La expresión de ARNm de *THEMIS* resultó indetectable en esta línea en todas las condiciones. Los niveles de *PTPRK* y de *RUNX3* no mostraron cambios ante la presencia del digesto de gliadinas (Figura 17).

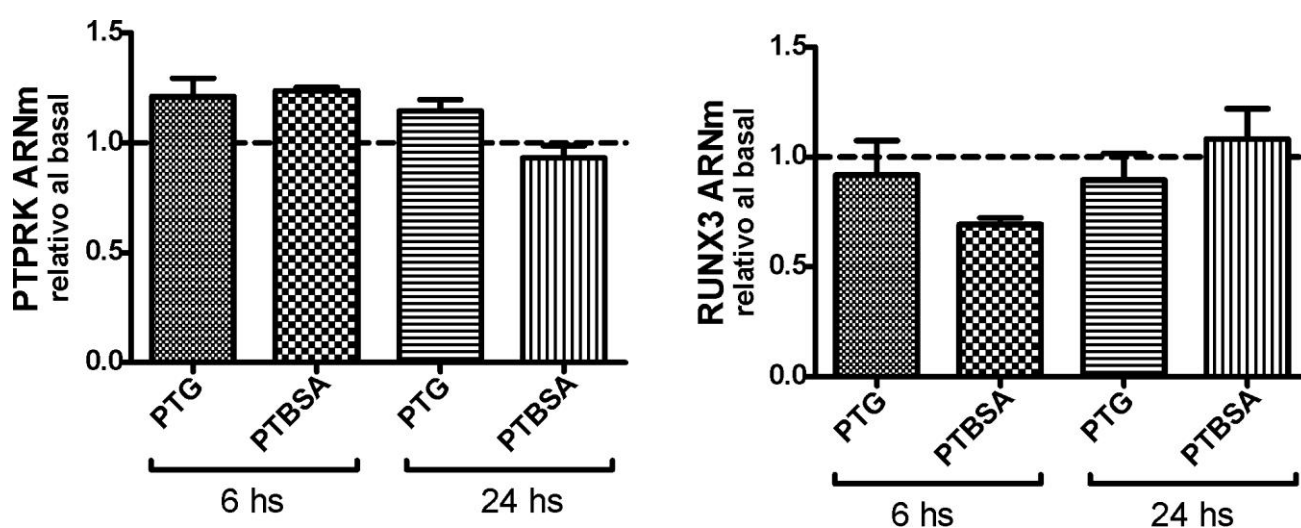


Figura 17. Efecto de PT-gliadina en la expresión de *PTPRK* y *RUNX3* en células T84. Niveles de expresión de *PTPRK* ARNm y *RUNX3* ARNm determinados por PCR en tiempo real en células de línea T84 incubadas con PT-Gliadina o PT-BSA como control. Se muestran los niveles relativos a la expresión basal (sin estímulo). No se observaron diferencias significativas.

Discusión

La búsqueda de genes asociados a una patología tiene relevancia en la comprensión de los mecanismos de la patogenia, y a la vez, puede ser de utilidad como herramienta diagnóstica. Las patologías multifactoriales y multigénicas generan un gran desafío en este campo, ya que la identificación de genes de relevancia es muchas veces difícil dado que sus contribuciones individuales pueden ser mínimas, e incluso pueden variar sustancialmente al estudiar diferentes poblaciones. Por lo tanto, el análisis de asociación genética constituye una herramienta muy útil en la búsqueda de regiones de susceptibilidad a enfermedades complejas, pero requiere del replicado en diferentes poblaciones para confirmar la información obtenida. Si bien el resultado de asociación es importante en sí mismo, es necesario destacar la importancia de realizar a la par estudios funcionales, especialmente sobre el tejido afectado en la patología en estudio. De esta manera, es posible evaluar si la variante polimórfica tiene algún efecto sobre la expresión génica.

En este trabajo nos enfocamos en dos regiones genómicas particulares, ambas con señales de asociación con EC a nivel de la población general: una región en el cromosoma 1 (25,08-25,18 Mb) que aloja a *RUNX3* y otra en el cromosoma 6 (127,99-128,38 Mb) que aloja a *THEMIS* y *PTPRK*. Sobre estas regiones hemos realizado análisis genéticos y funcionales en muestras de población celíaca y control.

Dentro de la región del cromosoma 1, el análisis de asociación para rs10903122 realizado en este trabajo sobre la población española, no replicó la asociación puesta de manifiesto por el GWAS (Dubois et al., 2010). El análisis de los datos del Immunochip pertenecientes a la población CEGEC tampoco logró replicar dicha señal, ni la del mismo Immunochip (rs72657048). A pesar de esto, el SNPs rs2236852 mostró una asociación nominal para esta región con EC en la población estudiada, aunque sin influenciar directamente el fenotipo. A raíz de la señal de asociación, estudiamos la expresión de ARNm de *RUNX3* en biopsias duodenales y observamos una expresión incrementada al momento del diagnóstico de EC en pacientes respecto a controles. Dichos niveles normalizaron en los pacientes luego de dos años de DLG. Estas observaciones resultan interesantes dado que este factor de transcripción está directamente implicado en la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia un perfil Th1, particularmente en la inducción de la expresión de IFN γ , citoquina crítica en EC (Djuretic et al., 2007; Yagi et al., 2011). Además, *RUNX3* juega un rol

importante en la diferenciación y función de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Puntualmente se ha sugerido su participación en la producción de perforinas y granzima B, y en la expresión sostenida de IFN γ (Cruz-Guillot et al., 2009). Dado que en la mucosa duodenal con EC activa abundan los linfocitos T CD4⁺ Th1 así como también los linfocitos T citotóxicos, este incremento en la expresión de RUNX3 a nivel de ARNm observado en duodeno de pacientes con EC activa podría ser reflejo de estas poblaciones celulares sobre-representadas. A su vez, se ha propuesto que RUNX3 cumpliría un rol crítico *downstream* TGF β en la generación de cambio de clase a IgA en linfocitos B, hecho que es de relevancia en la mucosa intestinal (Watanabe et al., 2010). Por otro lado, *RUNX3* ha sido caracterizado como un gen supresor de tumores, especialmente en la mucosa gástrica, pero también en otros tipos de tumor como los del tracto colorrectal (Yano et al., 2006; Tong et al., 2009; Lee et al., 2010). Sin embargo, distintas líneas celulares de cáncer colorrectal presentan patrones diferentes de expresión de *RUNX3* que varían desde no detectable hasta una alta expresión (Lee et al., 2010). Existe una importante controversia en cuanto a la expresión de *RUNX3* en células epiteliales del intestino, y ha sido puesta en duda su expresión en este tipo de células *in vivo* (Brenner et al., 2004; Levanon et al., 2011). Nuestros ensayos *in vitro* sobre la línea celular de enterocito T84, si bien demuestran la expresión de este factor de transcripción en la línea, no evidenciaron cambios en la expresión del ARNm de RUNX3 ante la presencia de gliadinas. Es evidente que resta investigar el rol de este factor de transcripción en células epiteliales intestinales, en particular sobre intestino delgado.

Asimismo, la relación de RUNX3 con diferentes entidades autoinmunes ha sido señalada ampliamente aunque el rol específico de este factor de transcripción en las mismas no está del todo descrito (Alarcón-Riquelme, 2004). En particular en intestino, RUNX3 ha sido estudiado en el marco de enfermedades inflamatorias intestinales (IBD). Ratones *knock out* para *RUNX3* generan espontáneamente un cuadro de colitis que asemeja el observado en IBD, el cual estaría mediado principalmente por leucocitos y no por células epiteliales (Brenner et al., 2004). Además se ha descrito asociación genética para *RUNX3* con IBD (Weersma et al., 2008), por lo que claramente constituye un gen candidato de susceptibilidad para esta patología. De manera análoga a lo observado en este capítulo, el nivel de ARNm de RUNX3 se vio aumentado en secciones inflamadas del colon de pacientes con IBD respecto a las zonas no inflamadas. Es interesante destacar que la expresión de RUNX3 se observó en células de la mucosa no epiteliales, tanto en íleon como colon (Weersma et al., 2008).

Análogamente, hemos enfocado el estudio de la región de interés en el cromosoma 6. Los estudios de asociación para rs802734 realizados en este trabajo sobre la población española no reprodujeron la asociación puesta de manifiesto en el GWAS. El análisis de los datos del ImmunoChip pertenecientes a la población CEGEC tampoco logró replicar la señal del GWAS ni la del mismo ImmunoChip (rs55743914 y rs72975916). A pesar de esto, varios SNPs en estas regiones mostraron asociación nominal en esta población (rs10484718, rs9491896 y rs9402010), aunque no mostraron influir de manera directa sobre la expresión de los genes estudiados, a excepción de aquellos pacientes homocigotas para el alelo rs802734*G, quienes presentaron una mayor expresión de ARNm de THEMIS cuando se los evaluó en DLG. De todas maneras, esta influencia debe interpretarse con cuidado, dada la baja frecuencia del genotipo homocigota GG entre los pacientes estudiados. Además, hay dos hechos que contradicen el posible efecto de rs802734. Por un lado, este mismo SNP fue testeado en el ImmunoChip general, a posteriori del GWAS, y no confirmó la asociación con EC; y por otro, la base de datos ENCODE no revela ninguna implicación funcional de las variantes de este SNP ni las asociadas con él.

Esta región genómica ha demostrado estar asociada a EC en otras etnias, como la población India, lo que resalta el aporte de estos genes a la susceptibilidad a esta enfermedad (Senapati et al., 2014). Sin embargo, no está claro si existe una relación causal entre los genotipos asociados y la enfermedad. Estudios de la relación del genotipo de rs802734 y otras variables de la región sobre la expresión de genes aledaños en timo tampoco mostró influencias directas (Amundsen et al., 2014).

En la región del cromosoma 6 estudiada, también hemos observado expresiones génicas diferenciales. La expresión de ARNm de THEMIS en duodeno se encontró incrementada en aquellos pacientes celíacos al diagnóstico comparando con pacientes en DLG y con controles no celíacos. *THEMIS* se expresa en diferentes estadios de las células T CD4⁺ y participa en la señalización post-activación del TCR (Fu et al., 2009; Lesourne et al., 2009; Brockmeyer et al., 2011). Por lo tanto, su incremento en la mucosa duodenal con EC activa podría explicarse por el gran infiltrado de estas células y su activación.

Por otro lado, encontramos una expresión de ARNm de PTPRK disminuida en EC activa. PTPRK cumple un rol importante en el mantenimiento de las uniones intercelulares al generar interacciones homólogas entre células adyacentes, y al mantener desfosforilada a β -catenina y sostener

consecuentemente su presencia en el complejo de uniones adherentes (Schnekenburger et al., 2005; Anders et al., 2006). Es posible inferir entonces que su expresión disminuida en EC activa esté relacionada con el incremento en la permeabilidad de la barrera intestinal observada durante la patología (Heyman et al., 2012). Diferentes señales de asociación genética con EC en regiones que albergan genes involucrados en las uniones estrechas indican que la alteración en la permeabilidad intestinal podría ser causante de la EC, aunque no hay evidencias funcionales de este hecho. En cambio, este aspecto podría ser consecuencia del estado inflamatorio crónico. En este sentido jugaría un papel $IFN\gamma$, capaz de desestabilizar las uniones estrechas mediante la internalización de sus proteínas (Heyman et al., 2012); o la zonulina, un regulador negativo de la estabilidad de estas uniones que se encuentra aumentado en EC (Fasano et al., 2000).

Por otro lado PTPRK participa en la vía de activación del EGFR, involucrada en diversos y numerosos procesos tales como proliferación y diferenciación celular. PTPRK desfosforila a EGFR inhibiendo así la proliferación celular (Xu et al., 2005, 2010). La baja expresión de PTPRK en EC activa coincide con un estado de activación del EGRF observado en enterocitos de pacientes con esta patología, un aspecto relevante que podría participar en el fenómeno de hiperproliferación de criptas observado (Nanayakkara et al., 2013b). Estas vías son también de interés en el contexto de los efectos directos que tienen algunos péptidos derivados del gluten al prolongar la activación del EGFR (Barone et al., 2007, 2011). Es necesario profundizar los estudios acerca de la expresión y localización celular de PTPRK en la mucosa duodenal con el fin de describir su rol en la patología.

Continuando los análisis sobre la región del cromosoma 6, observamos por un lado una marcada correlación positiva entre la expresión a nivel de ARNm de THEMIS y de PTPRK en pacientes celíacos (tanto al momento del diagnóstico como luego de dos años de tratamiento) pero no en controles; y sustentando aún más este hecho, los valores relativos de cambio de expresión de *THEMIS* y *PTPRK* entre la EC activa y luego del tratamiento, mostraron una marcada correlación. Sumado a esto, los cambios relativos de expresión post-estimulación con PT-gliadina *ex vivo* sobre tejido proveniente de pacientes en DLG incubados también mostraron correlación. Esto sugiere la existencia de mecanismos regulatorios compartidos en la expresión de *PTPRK* y *THEMIS* que ocurren y/o se alteran específicamente en la EC. A pesar de estas observaciones, no fue posible detectar una influencia clara de las gliadinas sobre la expresión de estos genes en biopsias de

pacientes en DLG ni en la línea celular enterocítica T84 (en este último caso solo se observó expresión de *PTPRK* pero no de *THEMIS*).

Es importante destacar que la expresión de los tres genes estudiados en este capítulo en mucosa de pacientes en DLG no difiere de aquella observada en controles, con lo cual la exclusión dietaria del gluten es suficiente para que la actividad transcripcional retorne a la normalidad. Esta situación da a entender que los cambios en la expresión responderían al estado inflamatorio crónico que caracteriza a la enfermedad más que a una alteración genética que provoque alteraciones per se y por ende predisposición a EC.

La identificación de los efectos funcionales de las señales de asociación en enfermedades complejas sigue siendo una tarea desafiante que dista de ser resuelta. En este trabajo, si bien no fueron identificadas variantes genómicas con efectos visibles sobre la expresión de los genes de interés, se sugiere firmemente la existencia de relaciones complejas de regulación que residirían en el genoma no codificante funcional, tal cual lo demuestra la co-expresión de *THEMIS* y *PTPRK* en tejido duodenal de pacientes celíacos y post-estimulación *in vitro*. Se necesitan estudios más profundos acerca de estos dos últimos genes para clarificar los mecanismos de co-regulación en el duodeno de pacientes con EC y de esta manera caracterizar los mecanismos moleculares por los cuales las variantes genéticas asociadas son una influencia en el riesgo de padecer EC.

Conclusiones

- * Observamos una asociación nominal con EC en las dos regiones genómicas estudiadas, señalada por SNPs diferentes a los de la población global.
- * La estrategia de selección de genes candidato a través de características posicionales resultó útil dado que permitió describir tres genes (*RUNX3*, *THEMIS* y *PTPRK*) expresados diferencialmente en duodeno de pacientes con EC activa.
- * La expresión de los tres genes retorna a valores comparables con los de tejido sano cuando el paciente se adhiere a una DLG.
- * El desafío de biopsias duodenales de pacientes en DGL con PT-gliadina no induce cambios en la expresión del ARNm de *PTPRK* ni *THEMIS* a tiempos cortos.

- * Las variantes de SNPs aquí estudiadas no mostraron influenciar la expresión de sus genes aledaños de manera directa.
- * Podrían existir mecanismos regulatorios en común entre los genes *PTPRK* y *THEMIS* activos en la mucosa duodenal del paciente celíaco.
- * En el esquema de la **Figura 18** se resume la estrategia aquí empleada, los resultados y sus posibles implicancias funcionales.

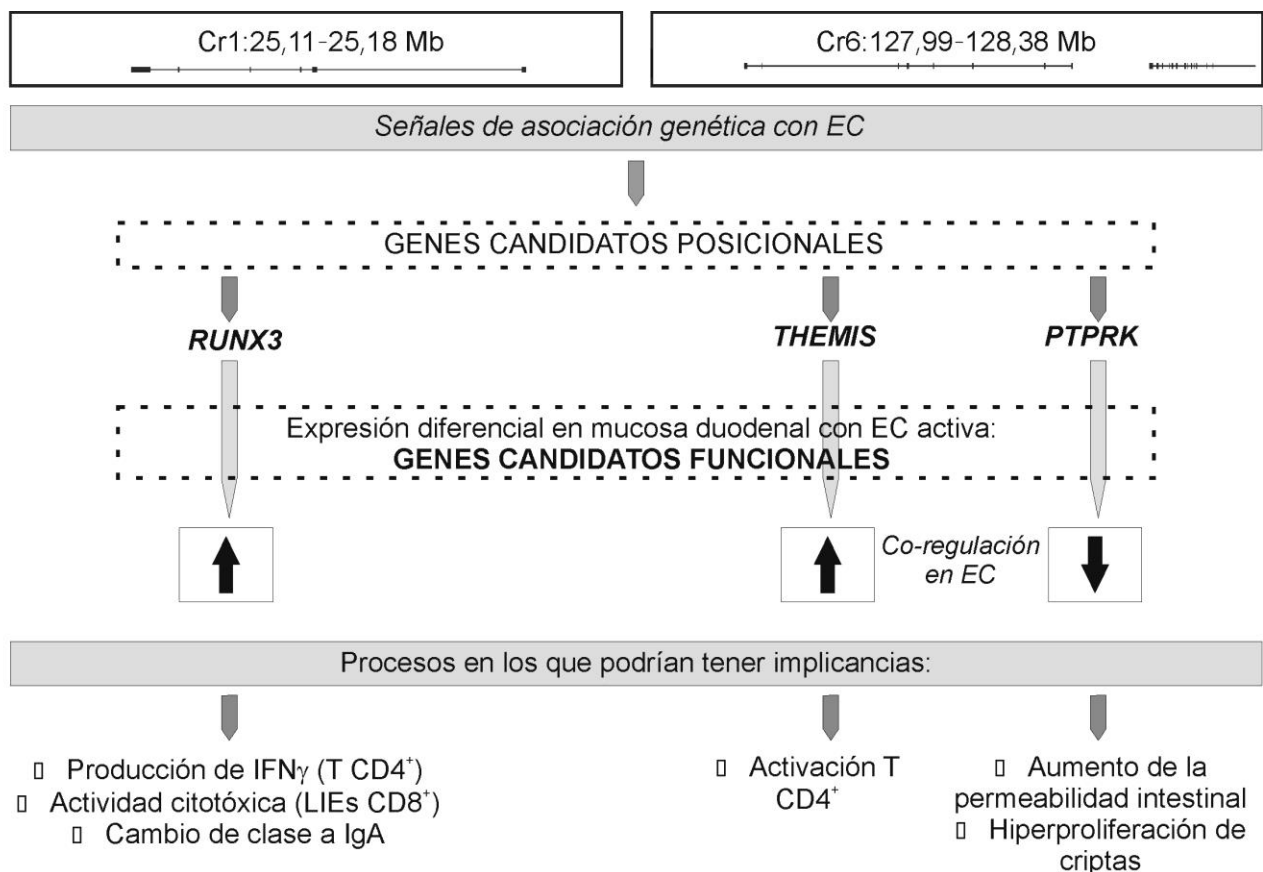


Figura 18. *RUNX3*, *THEMIS* y *PTPRK*: genes candidatos posicionales y funcionales en EC.

Capítulo 2

Estudio de la expresión y modulación del eje CXCR3/CXCL10 en Enfermedad Celíaca

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en el artículo: “*Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease*”. Bondar C, Araya R, Guzmán L, Cueto Rúa E, Chopita N and Chirido F PLoS ONE (2014) 9(2): e89068.

Introducción

En la mucosa de intestino delgado de pacientes con EC activa se observa infiltrado linfocitario en LP y en el epitelio. Estos son signos característicos y parte de los hallazgos utilizados en el diagnóstico histológico de EC. En LP se observan mayoritariamente células plasmáticas y linfocitos T, mientras que en el epitelio, la población de LIEs está constituida por linfocitos T TCR $\alpha\beta^+$ (en su mayoría CD8⁺), linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ y células NK (Abadie et al., 2012).

Como consecuencia de la activación de linfocitos T y B, algunas de estas poblaciones son expandidas localmente. Sin embargo, un aumento tan marcado en el número de células puede resultar de la proliferación local y también de mecanismos de reclutamiento celular selectivo. Los mecanismos de migración que incrementan el número de células y localizan las distintas poblaciones en regiones definidas, no han sido estudiados en condiciones de enteropatía de intestino delgado.

En condiciones homeostáticas, la migración celular es realizada esencialmente en tres etapas: la adhesión de la célula a la pared vascular, el pasaje de la misma a través del endotelio (extravasación) y, una vez en el tejido, la migración hacia un sitio definido. En el primer paso es crítica la interacción de moléculas como selectinas y β_1 -integrinas, expresadas en la membrana celular, con sus ligandos sobre el endotelio. La migración en el tejido es gobernada por un complejo sistema de ligandos, conocidos como quimoquinas, y sus receptores. Existen unas 40 quimoquinas en el ser humano que, desde el punto de vista estructural, se clasifican de acuerdo a la posición relativa de dos residuos de cisteína conservados. Los dos principales grupos son: CC (con los dos residuos situados de manera adyacente) y CXC (ambos residuos separados por un aminoácido). Existen también dos grupos menores: XC (carecen del primer residuo de cisteína) y CX₃C (ambos residuos están separados por tres aminoácidos). Los receptores de quimoquinas

reciben el nombre de acuerdo al tipo de ligando que unen (CCR, CXCR, etc.) y se han descrito un total de 18 (Ebert et al., 2005). Este sistema, con su gran número de quimoquinas y receptores, es complejo y bastante promiscuo, con más de un ligando para un mismo receptor y viceversa (**Tabla 8**).

Los receptores de quimoquinas pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G, y son muchas las vías intracelulares que se disparan luego de la unión a su ligando. De manera genérica, los segundos mensajeros *downstream* a la activación de estos receptores abarcan principalmente a PLC β (*phospholipase C* β), Serina/Treonina quinasas y PI3K γ (*phosphatidylinositol 3-kinase*- γ). Aunque han sido reportado varios efectos luego de la unión quimoquina-receptor, el más importante es el de quimotaxis, por el cual la célula que expresa el receptor sufre modificaciones en su citoesqueleto y en la afinidad de sus moléculas de adhesión, y migra hacia regiones de mayor concentración de ligando. Las quimoquinas son secretadas, con lo cual, para no diseminarse y generar el gradiente necesario para ejercer su efecto quimiotáctico, se unen a glicosaminoglicanos (GAGs) cargados negativamente de la matriz extracelular o superficie celular. Estos GAGs son expresados de manera diferencial dependiendo del tejido, y tienen distintas afinidades por las diferentes quimoquinas, fenómeno que ayuda a direccionar la migración celular de manera selectiva. En la mayoría de los casos, la respuesta celular disparada por quimoquinas es de rápido montaje y corta permanencia, dado que existen mecanismos de desensibilización mediante los cuales los receptores son internalizados. En la desensibilización homóloga un receptor es fosforilado por una quinasa acoplada luego de la unión a su ligando e internalizado; en la desensibilización heteróloga ocurre la internalización por fosforilación del receptor aún sin unión a ligando, mediada por una quinasa activada por otra vía. Estos mecanismos permiten una redistribución continua del receptor y una detección polarizada de quimoquinas, lo que hace más efectivo el proceso de migración específica (Olson y Ley, 2002; Ebert et al., 2005).

Tabla 8. Quimoquinas y receptores.

	CCR1	CCR2	CCR3	CCR4	CCR5	CCR6	CCR7	CCR8	CCR9	CCR10	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR5	CXCR6	XCR1	CX ₃ CR1
CCL1								▲										
CCL2		▲																
CCL3	▲				▲													
CCL4	▲		▲		▲													
CCL5	▲	▲	▲		▲													
CCL7	▲	▲	▲		▲													
CCL8	▲	▲																
CCL11			▲															
CCL13	▲	▲	▲															
CCL14	▲				▲													
CCL15	▲		▲															
CCL16	▲	▲			▲													
CCL17				▲														
CCL18								▲										
CCL19							▲											
CCL20						▲												
CCL21							▲											
CCL22				▲														
CCL23	▲																	
CCL24			▲															
CCL25									▲									
CCL26			▲															
CCL27										▲								
CCL28			▲															
CXCL1												▲						
CXCL2												▲						
CXCL3												▲						
CXCL4													▲					
CXCL5											▲	▲						
CXCL6											▲	▲						
CXCL7												▲						
CXCL8											▲	▲						
CXCL9													▲					
CXCL10													▲					
CXCL11													▲					
CXCL12														▲				
CXCL13															▲			
CXCL14																		
CXCL16																▲		
CXCL17																		
XCL1																	▲	
XCL2																	▲	
CX ₃ CL1																		▲

Se muestran las interacciones clásicas entre las diferentes quimoquinas (eje vertical) y receptores (eje horizontal). El símbolo ▲ indica interacción entre las moléculas. No se conocen receptores para CXCL14 ni para CXCL17. *Adaptado de Steen et al., 2014.*

Las quimoquinas pueden clasificarse además en cuanto a su función en homeostáticas, las cuales son constitutivamente producidas, y en inflamatorias, las cuales son producidas por células activadas en un entorno inflamatorio. Esta separación sin embargo no es estricta dado que no todas pueden incluirse inequívocamente en una de las dos categorías. En algunos casos, quimoquinas y receptores son restringidos a un solo tipo de proceso, mientras que en otros, el mismo par puede ser usado por diferentes células con distintas consecuencias. Además, en ciertos casos existen efectos sinérgicos o redundantes entre aquellos ligandos que comparten un mismo receptor, mientras que también se puede observar que distintos ligandos disparen vías diferentes en el mismo receptor (Steen et al., 2014). Es decir que se trata de un sistema verdaderamente complejo, donde existen pocos casos de relaciones unívocas y en el cual la mayoría muestra redundancia o solapamiento. En la **Tabla 9.1** se muestra para cada receptor las células que lo expresan y en la **Tabla 9.2** algunos ejemplos de quimoquinas y dónde son producidas.

Tabla 9.1. Receptores de quimoquinas.

Receptor	Tipo celular
CXCR1	mastocitos, monocitos, macrófagos y PMN
CXCR2	mastocitos, monocitos, macrófagos y PMN
CXCR3	Linfocitos T (Th1), Linfocitos B y Células NK
CXCR4	Linfocitos T y precursores, Linfocitos B, PMN, monocitos y macrófagos
CXCR5	Linfocitos B, Linfocitos T de memoria
CXCR6	Linfocitos T de memoria
CCR1	Linfocitos T de memoria
CCR2	monocitos, CD, Células NK, basófilos y PMN
CCR3	eosinófilos, basófilos, mastocitos y Linfocitos T (Th2)
CCR4	Linfocitos T (Th2)
CCR5	Linfocitos T (Th1), monocitos, macrófagos y CD
CCR6	Linfocitos T de memoria, CD
CCR7	Linfocitos T, Linfocitos B, CD
CCR8	Linfocitos T (Th2)
CCR9	Linfocitos T $\alpha 4\beta 7^+$, macrófagos, CD, timocitos
CCR10	Linfocitos T CLA ⁺
CX₃CR1	PMN, monocitos, macrófagos, Células NK, Linfocitos T
XCR1	Linfocitos T

CD: células dendríticas; PMN: células polimorfonucleares. CLA: *cutaneous lymphocyte antigen*. Adaptado de Olson y Ley, 2002.

Tabla 9.2. Ejemplos de tejidos donde son expresadas algunas quimoquinas.

Quimoquina	Tejidos de expresión
CXCL8	Sitios de inflamación neutrofilica
CXCL9/CXCL10/CXCL11	Inflamación Th1; SNC, intestino
CXCL12	Timo, MO, órganos linfáticos secundarios
CXCL13	Folículos linfoides
CCL2	Inflamación Th1; SNC, hígado, pulmón
CCL3/CCL4	Inflamación Th1; SNC, pulmón
CCL5	inflamación Th1, Th2; pulmón, SNC
CCL19	Folículos linfoides (zona T)
CCL20	vellosidad intestinal, piel
CCL21	órganos linfoides, HEV
CCL25	intestino delgado, timo

SNC: sistema nervioso central; HEV: vénulas del endotelio alto; MO: médula ósea. *Adaptado de Olson y Ley, 2002.*

En el caso particular de la migración celular en mucosa de intestino delgado, las CD presentes en LP capturan y procesan antígenos provenientes del tejido o del lumen intestinal y migran a los GLM donde activan y diferencian linfocitos T CD4⁺ vírgenes. Durante la activación y diferenciación T, las CD inducen la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y del receptor de quimoquina CCR9. Luego de la diferenciación, estos linfocitos T CD4⁺ circulan por el torrente circulatorio y arriban a sitios particulares de los vasos de la LP, donde se produce el pasaje trans-endotelial guiado por la molécula de adhesión MadCAM1 (expresada en la pared del endotelio) y la integrina $\alpha 4\beta 7$. Una vez en el tejido, el ligando que media el reclutamiento de células CCR9⁺ es la quimoquina CCL25, expresada constitutivamente en la mucosa de intestino delgado. Estos pares de ligando y receptor están involucrados en la migración selectiva de linfocitos hacia la mucosa intestinal en condiciones homeostáticas (Johansson-Lindbom y Agace, 2007; Gorfu et al., 2009).

En cambio, durante procesos inflamatorios, el reclutamiento celular está preferencialmente guiado por otras vías. Una de ellas es la del eje quimiotáctico de CXCR3, una de las más importantes en el reclutamiento celular hacia sitios de inflamación (Groom y Luster, 2011a). Por ejemplo, la participación del eje CXCR3 ha sido demostrada en casos de inflamación crónica como artritis reumatoidea (Lee et al., 2009; Laragione et al., 2011) y enfermedad inflamatoria intestinal (Schroepf et al., 2010; Hosomi et al., 2011; Ostvik et al., 2013). CXCR3 se expresa principalmente en linfocitos T y B, células NK, eosinófilos y monocitos (Lacotte et al., 2009). En particular, las

células CD4⁺ del perfil Th1 expresan preferencialmente este receptor, y de hecho en muchos casos ha sido utilizado como indicador del perfil Th1 (Loetscher et al., 1996; Sallusto et al., 1998; Groom y Luster, 2011a). Este aspecto es particularmente relevante dado que en el caso de EC, la activación de linfocitos T está direccionada hacia un perfil Th1.

La activación de CXCR3 induce la proliferación y migración celular. Este receptor interactúa con tres ligandos, CXCL9, CXCL10 y CXCL11, quimoquinas cuyas funciones biológicas no son completamente redundantes. Estas son inducidas por IFN γ pero su patrón de expresión difiere entre tejidos y aún no ha sido descrito por completo (Groom y Luster, 2011b). De los tres ligandos, CXCL10 muestra una mayor asociación con autoinmunidad (Nicoletti et al., 2002; Antonelli et al., 2008; Laragione et al., 2011). CXCL10 es producido por linfocitos T CD4⁺, células NK y NKT, monocitos, CD, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales (Lee et al., 2009; Liu et al., 2011). Además de IFN γ , hay otros estímulos capaces de inducir CXCL10 y por lo tanto amplificar la cascada inflamatoria, tales como TNF α y los IFN de tipo I (Groom y Luster, 2011b). Cabe aclarar que ha sido descrito un cuarto ligando de CXCR3, CXCL4, cuya principal fuente son las plaquetas activadas y cumpliría funciones relacionadas a la modulación de la angiogénesis. Dado que la señal que imparte no es suficiente como para generar acciones migratorias en las células blanco en el tejido de interés, no fue incluido en este estudio (Vandercappellen et al., 2011).

El reclutamiento selectivo de células con funciones efectoras en el daño tisular ha sido caracterizado en varias patologías inflamatorias y autoinmunes. La interferencia de la llegada de células efectoras a los sitios de daño es considerada una estrategia de intervención terapéutica (Proudfoot, 2002; Villablanca et al., 2011). Por lo tanto, dado que los linfocitos CD4⁺ Th1 dominan la fase crónica de la EC, el avance en el conocimiento del rol del eje CXCR3 y sus ligandos en esta patología aportará conocimiento sobre los mecanismos básicos de daño pero además podría constituir una nueva propuesta de estrategia terapéutica.

Objetivos específicos

La marcada infiltración de linfocitos en LP de mucosa duodenal y el incremento en los LIEs son aspectos típicos en EC. A pesar de esto, los mecanismos que subyacen este reclutamiento específico no han sido estudiados.

Considerando la información descrita previamente, y dado que los linfocitos T CD4⁺ del perfil Th1 expresan preferencialmente el receptor CXCR3 y están claramente involucradas en los mecanismos de daño que convergen en la enteropatía severa, el objetivo fue estudiar el rol del eje CXCR3/CXCL10 en el reclutamiento linfocitario en EC activa. Con este fin nos propusimos:

- Analizar la expresión de CXCR3 y sus ligandos CXCL9, CXCL10 y CXCL11 a nivel de ARNm en mucosa duodenal.
- Caracterizar la expresión de CXCR3 y de sus ligandos en células de la LP y del compartimento intraepitelial de la mucosa duodenal.
- Estudiar la modulación de CXCR3 y sus ligandos mediante estímulos de la inmunidad innata.
- Evaluar el uso de CXCL10 sérico como biomarcador en EC.

Materiales y métodos

Pacientes y muestras

Las biopsias duodenales de pacientes adultos y pediátricos fueron obtenidas durante el procedimiento diagnóstico de rutina de EC realizados en los servicios de gastroenterología del Hospital Interzonal General de Agudos, General San Martín (HIGA San Martín) y del Hospital Sor María Ludovica, ambos de la ciudad de La Plata.

Para los estudios de expresión génica se obtuvieron en total muestras de 26 pacientes celíacos al diagnóstico (6 adultos y 20 niños), 6 pacientes celíacos en DLG (3 adultos y 3 niños) y 25 biopsias correspondientes a individuos no celíacos (9 adultos y 16 niños) (**Tabla 10**). El diagnóstico de EC se realizó considerando criterios de histología, análisis serológicos y signos clínicos. Aquellos pacientes en dieta presentaron al momento de la toma de muestra una histología normal a nivel de la mucosa duodenal y serología negativa para marcadores de EC de rutina. Los individuos del grupo control fueron sometidos al estudio endoscópico por otros motivos (principalmente dispepsia o diarrea). Todos ellos presentaron al momento de la toma de muestra serología negativa para marcadores de EC e histología duodenal normal. Las muestras destinadas a análisis de expresión génica se conservaron en RNAlater (Ambion, cat AM7020) y fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. En cada caso se obtuvo una biopsia adicional que fue fijada en formol e incluida en parafina para análisis de inmunofluorescencia.

Tabla 10. Distribución de pacientes según edad y género.

Grupo	Población	Fem. (n)	Masc. (n)	Edad media	Rango
Control	Adulta	6	3	41	30-61
Control	Pediátrica	9	7	6	9-14
EC al diagnóstico	Adulta	6	0	35	20-47
EC al diagnóstico	Pediátrica	8	12	6	3-14
DLG	Adulta	2	1	49	26-66
DLG	Pediátrica	3	0	6	3-10

La edad está expresada en años. Fem: femenino; Masc: masculino.

Para los estudios de cultivo *in vitro*, fueron obtenidas dos piezas de biopsia por paciente, las cuales fueron transportadas en medio RPMI en frío de manera inmediata para su procesamiento.

Para los estudios por citometría de flujo se obtuvieron 3 piezas de biopsia duodenal por cada individuo. Se transportaron de igual manera hasta el laboratorio para su inmediato procesamiento. Se incluyeron 3 pacientes celíacos y 3 individuos controles pediátricos.

En algunos casos, al momento del estudio diagnóstico se realizó una extracción de sangre y consiguiente separación del suero para el estudio por ELISA cuantitativo de los niveles de CXCL10 circulante. Se incluyeron en este ensayo un total de 26 pacientes celíacos al diagnóstico (15 adultos y 11 niños), 9 celíacos en DLG (6 adultos y 3 niños) y 21 pacientes de población control (14 adultos y 7 niños).

Consideraciones éticas

Todos los pacientes incluidos en el estudio, o sus padres o tutores cuando correspondía, dieron su consentimiento informado por escrito. El estudio se realizó en el marco de un proyecto aprobado por el comité de ética del Hospital Interzonal General de Agudos, General San Marín (HIGA San Martín) y por el comité de ética del Hospital Sor María Ludovica, La Plata.

Estudios de expresión génica por PCR cuantitativa

Se realizó una extracción de ARN total a partir de una biopsia duodenal entera por individuo. Se utilizó un kit comercial (RNA Spin Mini kit, GE Healthcare cat 25-0500-72). La calidad y cantidad del ARN total fue determinada mediante métodos espectrofotométricos convencionales. La retrotranscripción para obtener ADNc se realizó a partir de 1µg del ARN total. Se utilizaron *random primers* y la polimerasa MML-V (Molecular Probes, Invitrogen). La PCR cuantitativa se realizó en un equipo IQ-Cycler (Bio-Rad) utilizando la mezcla SYBR Green (Invitrogen, cat 11761-100). Como gen *housekeeping* se determinó β-actina. La expresión relativa del gen se calculó mediante el método “delta ct” (Ginzinger, 2002). En la **Tabla 11** se detallan las secuencias de los pares de primers empleados en este capítulo. Los protocolos de corrida corresponden a: 1) 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 45 segundos, y 95°C por 15 segundos; 2) 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 62°C durante un minuto, y 95°C por 15 segundos.

Tabla 11. Secuencia de primers utilizados (5' - 3').

GEN	Forward Primer	Reverse Primer	Programa
β-actina	ATGGGTCAGAAGTCCTATGTG	CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGTC	1 o 2
CXCL9	CCAAGGGACTATCCACCTACAATC	GGTTTAGACATGTTTGAAGTCCATTC	1
CXCL10	CTGACTCTAAGTGGCATTCAAGGA	CAATGATCTCAACACGTGGACAA	1
CXCL11	GGGTACATTATGGAGGCTTTCTCA	GAGGACGCTGTCTTTGCATAGG	1
CXCR3	AGCTTTGACCGCTACCTGAA	TGTGGGAAGTTGTATTGGCA	1
IFNγ	GCAGAGCCAAATTGTCTCCT	ATGCTCTTCGACCTCGAAAC	2
TNFα	CTCAGCCTCTTCTCCTTCTCCT	TTCCGAGAAGATGATCTGACTGC	2
IFNβ	TGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAA	TTCATAGATGGTCAATGCGGCGT	2
IL-15	TGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCA	TCCTCCAGTTCCTCACATTCTTTG	1
IL-15Rα	GCCAGCGCCACCCTCCACAGTAA	GCCAGCGGGGAGTTTGCCTTGAC	1

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para estos ensayos se utilizaron biopsias duodenales incluidas en parafina. Se incluyeron pacientes celíacos (al diagnóstico y en DLG) y controles de ambas poblaciones, pediátricos y adultos. Se realizaron cortes de 5 μm de espesor en un micrótopo Leica. Las secciones fueron rehidratadas y posteriormente sometidas a calor sumergidas en una solución de recuperación antigénica comercial (Antigen Retrieval Citra Plus Solution, Biogenex, cat HK080-9K). Todas las secciones fueron bloqueadas con suero de cabra al 2% en PBS. Para la marcación de CXCR3 se realizó una incubación con 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo murino anti-CXCR3 humano (R&D Systems, cat MAB160) durante 1 hora y luego con una dilución 1:200 del fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo hecho en cabra anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-488 (Invitrogen, cat A11020), durante 30 minutos. Para la marcación simple de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 las muestras se incubaron con una dilución 1:50 de anticuerpos policlonales hechos en conejo y dirigidos contra cada uno de las quimoquinas humanas, según corresponda (anti-CXCL9: abcam, cat ab9720; anti-CXCL10: Santa Cruz, cat sc-28877; anti-CXCL11: abcam, cat ab9955), durante una hora y luego con una dilución 1:200 de un anticuerpo hecho en cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa-488 (Invitrogen, cat A11008), durante 30 minutos. Entre cada incubación, se realizaron lavados con PBS suplementado con 0,1% de Tween-20.

Para las marcaciones dobles, las muestras se incubaron primero con el anticuerpo anti-CXCL9, anti-CXCL10 o anti-CXCL11, y luego con una dilución 1:200 de un anticuerpo hecho en cabra

contra IgG de conejo conjugado a Alexa-647 (Invitrogen, cat A21246). Luego se incubaron durante toda la noche con anticuerpos hechos en ratón anti-CD3 (DBS, cat Mob112-05), anti-CD138 (DAKO, cat M7228) o anti-HAM56 (Genetex, cat GTX72010) humanos en una dilución 1:10, 1:25 o 1:50, respectivamente. Luego se realizó una incubación con el anticuerpo secundario (una dilución 1:200 del fragmento F(ab')₂ del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-488).

En todos los casos los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio a la concentración de 1 µg/ml durante 15 minutos (Sigma, cat P4170). Los preparados fueron montados utilizando un medio de montaje especial para fluorescencia (DakoCytomation, cat S3023) y visualizados en un microscopio confocal TCS SP5 de Leica. Las imágenes fueron obtenidas con el software Leica LAS AF.

Recuento de células CXCR3⁺ por inmunofluorescencia

Se trabajó con biopsias duodenales pertenecientes a 6 pacientes celíacos al diagnóstico, 6 pacientes en DLG y 9 controles no celíacos, todos de la población adulta. Se realizó la marcación de CXCR3 tal cual se describió anteriormente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma, cat D8417) a la concentración de 1µg/ml por 3 minutos. Los preparados se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti (fuente de luz: X-Cites Series 120 Q). Las imágenes se obtuvieron con una cámara Nikon (Nikon Digital Sight DS Ri1) y con el software Nis-Elements. El recuento de células positivas se realizó utilizando el software Image J, calibrado de manera tal de poder medir el área de zonas de LP seleccionadas. Las áreas de LP se seleccionaron a lo largo de toda la sección histológica y sobre las mismas se realizó el recuento. Se expresó el resultado como número de células CXCR3⁺ por mm² de LP. El recuento se realizó como mínimo sobre 150.000 µm² de LP por preparado. No se tuvo en cuenta el compartimento intraepitelial ni las criptas.

Determinación de CXCL10 sérico

La concentración sérica de CXCL10 se determinó por medio de un ELISA comercial (ELISA kit Human IP-10 (CXCL10) cat KAC2361, Invitrogen, Camarillo, USA). Las muestras de sangre fueron obtenidas de individuos adultos y pediátricos durante el procedimiento diagnóstico. El suero se conservó a -80°C hasta su procesamiento. Cada muestra fue diluida 1:2 o 1:10 antes de ser testeadas.

Estimulación *in vitro* de biopsias duodenales

Se obtuvieron dos biopsias duodenales por paciente celíaco o individuo control, y se procesaron de inmediato. Se utilizó como medio de incubación medio RPMI suplementado con 62,4 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 0,5 g/l de gentamicina (todas de laboratorios Bagó) y 10% de suero fetal de ternero (Gibco). Las muestras se incubaron a 37°C y 5% CO₂ en este medio solo o suplementado con estímulo según el ensayo: IL-15 recombinante humana (BD Pharmingen), poly I:C (*polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt*, Sigma Aldrich, cat P1530), péptido p31-43 (péptido derivado de gliadina; LGQQPFPPQQPY) o péptido 8mer (péptido derivado de gliadina, FPLQPQQP). En la **Tabla 12** se detallan los estímulos, la concentración empleada, tiempo de incubación y la cantidad de pacientes incluidos en cada protocolo. Luego de la incubación, las muestras fueron lavadas con HBSS con 0,5 g/l gentamicina y se procedió a la extracción de ARN y determinación de expresión génica (principalmente de CXCL10) tal cual se explicó anteriormente.

Tabla 12. Protocolos de cultivo *in vitro* de biopsias duodenales.

Estímulo	Concentración	Tiempo	Controles	Celíacos
Péptido p31-43	100 µg/ml	3 hs	13	14
Péptido p31-43	100 µg/ml	24 hs	5	10
Péptido 8mer	100 µg/ml	3 hs	8	5
IL-15	50 ng/ml	3 hs	18	19
IL-15	50 ng/ml	24 hs	5	8
Poly I:C	100 µg/ml	3 hs	14	4

Digestión de tejido y análisis por citometría de flujo

Se obtuvieron tres biopsias duodenales por paciente las cuales fueron transportadas en medio RPMI en frío hasta el laboratorio y procesadas de inmediato. La suspensión celular correspondiente a enterocitos y LIEs se obtuvo por incubación de las piezas en EDTA 1 mM en PBS durante 30 minutos en continua rotación a 37°C. La suspensión de células aisladas de LP se obtuvo realizando una digestión del remanente de las piezas con ADNasa I (Roche) y colagenasa (Sigma) por 30 minutos a 37°C en rotación. Esta suspensión celular fue pasada a través de un filtro de un tamaño de poro de 40 µm y lavada con PBS. Las células fueron bloqueadas con suero humano y marcadas con anticuerpos conjugados por 15 minutos. Luego de la incubación, las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS para ser analizadas en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo 7.6.2. Se utilizaron los siguientes anticuerpos hechos

en ratón (todos de BD Pharmingen): anti-CD183 humano (clon 1C6/CXCR3) conjugado a APC, anti-CD3 humano conjugado a FITC (clon UCHT1), anti-CD103 humano conjugado a PE (clon Ver-ACT8), anti-CD4 humano conjugado a PE (clon RPA-T4), anti-CD138 humano conjugado a PE (clon MI15) y controles de isotipo IgG1 k conjugados a APC, PE o FITC (clon MOP-21).

Cultivo celular

La línea celular humana Caco-2 (célula epitelial de colon) fue propagada en medio de cultivo DMEM (Sigma) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Gibco), 1% buffer HEPES 1M (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma) y 1% aminoácidos no esenciales (Gibco). Previo a estimular, las células fueron crecidas hasta confluencia sobre placas de 24 fosas, y luego cosechadas mecánicamente. Las líneas celulares humanas Daudi (linfoblastos B) y Jurkat (linfocitos T) fueron propagadas en medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 15% de suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomicina. La línea celular humana THP-1 (monocitos) fue cultivada en medio DMEM-GlutaMAX (Gibco) suplementado con 15% de suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomicina. Para su estimulación todas estas líneas fueron sembradas a razón de 200.000 células por fosa en placas de 96 pocillos. Las condiciones de cultivo fueron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Para estudios de expresión génica, las células Caco-2 y las células Daudi fueron incubadas durante 3 horas en medio solo o en presencia de los siguientes estímulos: IL-15 (50ng/ml), poly I:C (100 µg/ml) o IFN γ (50 ng/ml; Becton Dickinson, cat. 554617). En otro esquema de estimulación, las cuatro líneas celulares fueron cultivadas durante 6 horas en medio solo o en presencia de los siguientes estímulos: p31-43 (100 µg /ml), un péptido control no relacionado (PNR, LDPLIRGLLARPACALQV) (100 µg /ml), poly I:C (100 µg/ml) o IFN γ (50 ng/ml). Finalizada la estimulación, en todos los casos se realizó un lavado con PBS, y se centrifugaron las células y se resuspendieron en buffer de lisis para continuar el protocolo de extracción de ARN, obtención de ADNc y PCR cuantitativa ya descrito. La secuencia del péptido PNR corresponde al fragmento 535-551 de la tiroperoxidasa humana y ha sido utilizado previamente como control en ensayos donde se evalúa la actividad del p31-43 (Maiuri et al., 2003).

Análisis por citometría de flujo de líneas celulares

Las células Caco-2, crecidas en las condiciones previamente descritas, fueron sometidas a los siguientes estímulos durante 24 horas: p31-43 (100 µg/ml), poly I:C (100 µg/ml), IFN γ (50 ng/ml) o medio solo. Tres horas antes de finalizar el tiempo, se agregó brefeldina en las fosas (10 µg/ml, Invitrogen) para inhibir la secreción de la quimoquina al medio. Las células fueron cosechadas mecánicamente, lavadas con PBS y bloqueadas con suero humano durante 15 minutos. Se utilizó el kit de permeabilización "Cytotfix/Cytoperm" (BD Biosciences) según instrucciones del fabricante. Las células fueron luego incubadas secuencialmente con el anticuerpo anti-CXCL10 y el anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa-488 empleados en los protocolos de inmunofluorescencia. Como control se empleó un anticuerpo policlonal anti-ovoalbúmina hecho en conejo.

Las células Jurkat, crecidas en las condiciones previamente descritas, se incubaron por triplicado con los siguientes estímulos durante 24 horas: p31-43 (100 µg/ml), poly I:C (100 µg/ml), IL-15 (50 ng/ml) o medio solo. Luego las células fueron lavadas con PBS, bloqueadas con suero humano durante 15 minutos e incubadas con el anticuerpo anti-CD183 humano (clon 1C6/CXCR3) conjugado a APC durante 30 minutos. Se utilizó el control de isotipo de IgG1 k conjugado a APC (clon MOP-21).

Todas las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS para su evaluación en el citómetro FACSCalibur tal cual fue descrito anteriormente.

Inmunofluorescencia y recuento celular en Caco-2 estimuladas

Las células Caco-2 fueron cultivadas y estimuladas por triplicado en las condiciones descritas para citometría de flujo. En este ensayo se agregó además el estímulo control con PNR (100 µg/ml). Las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído 4% y sacarosa 4% en PBS durante 15 minutos, sometidas a dos lavados con NH $_4$ Cl 50 mM y permeabilizadas con tritón 0,1% en PBS durante 10 minutos. Luego de un bloqueo con suero de cabra al 2%, se realizó la marcación con incubaciones secuenciales con el anticuerpo anti-CXCL10 y el anti-conejo conjugado a Alexa 488 ya descritos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma, cat D8417) a la concentración de 1µg/ml por 3 minutos. Entre cada paso del protocolo se realizaron lavados con PBS-Tween 0,1%.

Los preparados se visualizaron utilizando el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti como ya fue descrito. Las imágenes se obtuvieron utilizando el objetivo 20x y se realizó el recuento sobre 3 campos en cada replicado. Se realizó el recuento de núcleos totales empleando la herramienta de analizador de partículas del software Image J. Las células positivas se contaron en forma manual y se expresaron los resultados como porcentaje de células CXCL10 positivas respecto al total de núcleos.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Las comparaciones de niveles de expresión o células positivas entre los grupos estudiados (pacientes celíacos, pacientes en DLG y controles) se realizaron utilizando un test T no pareado. Para los estudios de correlación se empleó el test de correlación de Pearson. Los niveles de expresión en los ensayos *in vitro* en biopsias de un mismo paciente en distintas condiciones se analizaron con un test T pareado. En los ensayos de cultivo celular o recuento por inmunofluorescencia de células Caco-2, los distintos tratamientos fueron comparados con la situación basal mediante un test T no pareado. En el caso de comparar niveles de inducción, se utilizó un test T para única muestra comparando con una media teórica igual a 1.

Resultados

Análisis de los niveles de CXCL10 en sangre periférica

La quimioquina CXCL10 ha sido encontrada en niveles aumentados en suero de pacientes que cursan distintas enfermedades inflamatorias o procesos autoinmunes tales como diabetes tipo I o esclerosis sistémica (Antonelli et al., 2008; Rabquer et al., 2011). Dada la naturaleza crónica de la enteropatía en EC y considerando que está fundamentalmente asociada a un perfil Th1, nos propusimos evaluar, por ELISA cuantitativo, los niveles de CXCL10 en suero de pacientes celíacos al diagnóstico, pacientes en DLG y controles de población pediátrica y adulta (Figura 19a). Dado que la distribución de los resultados no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos etarios, el análisis posterior fue realizado sobre el conjunto de los resultados de ambas poblaciones (Figura 19b). Se observa que los niveles de CXCL10 en suero fueron significativamente mayores en el grupo con EC activa respecto a controles. Los niveles de CXCL10 en el grupo en DLG resultaron levemente aumentados respecto al grupo control pero fueron menores a los observados en el grupo no tratado, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

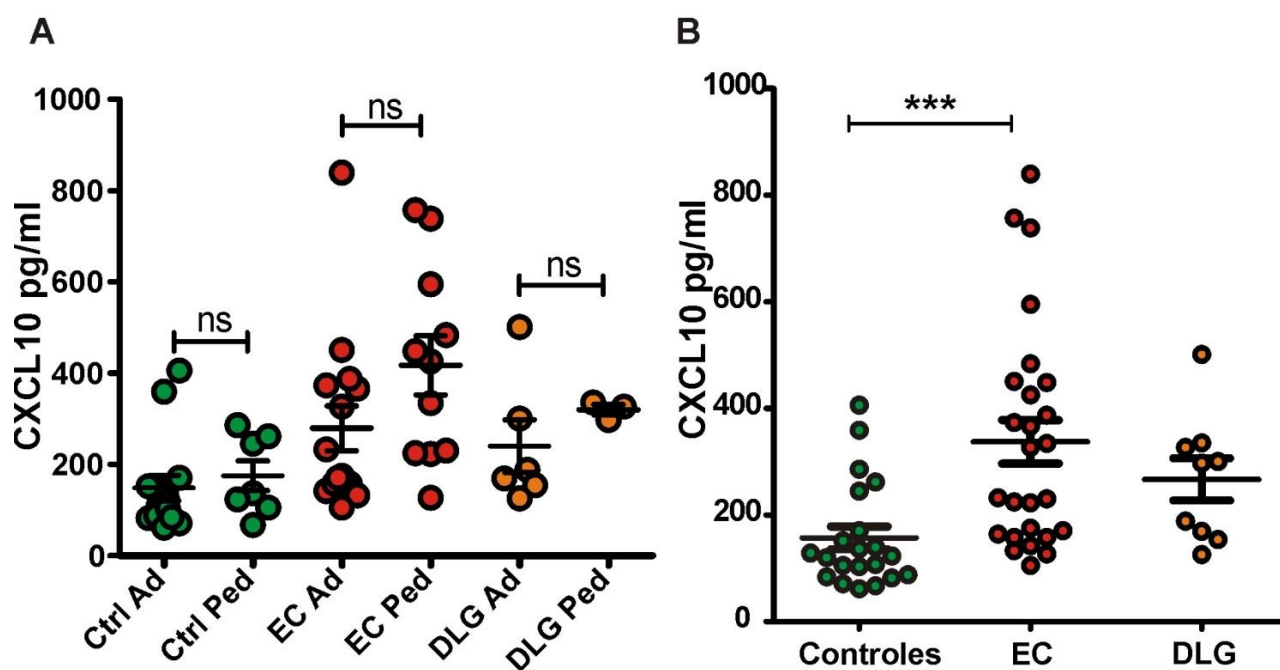


Figura 19. Determinación de los niveles séricos de CXCL10. A) Análisis por ELISA de CXCL10 circulante en población pediátrica (Ped) y adulta (Ad) en forma separada, de pacientes con EC al diagnóstico, pacientes en DLG y controles no celíacos. Test T no pareado; diferencias estadísticamente no significativas. B) Niveles séricos de CXCL10 en muestras de individuos de grupo control (n=21), pacientes al diagnóstico de EC (n=26) y pacientes en DLG (n=9). Test T no pareado; ***p<0,001.

Estos resultados muestran una relación entre los niveles de CXCL10 en sangre periférica y la enteropatía activa, y pensamos que esta observación podría vincularse con un incremento en la producción de CXCL10 en el sitio activo de inflamación, es decir, la mucosa duodenal.

Desde el punto de vista aplicado, la determinación de CXCL10 en sangre periférica puede resultar un biomarcador útil en el diagnóstico de EC, aunque se deben realizar estudios con un número mayor de muestras para poder estimar la capacidad predictiva de este ensayo.

Expresión de los ligandos de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) en mucosa duodenal

Los estudios de expresión en mucosa duodenal a nivel de ARNm se realizaron mediante PCR cuantitativa en muestras de biopsias duodenales. Nuevamente, se realizó un estudio comparativo entre pediátricos y adultos y se constató que el comportamiento en ambas poblaciones es similar (**Figura 20a**). Por esta razón, de aquí en adelante se trató a ambas poblaciones en conjunto (**Figura 20b**). Se observaron niveles de ARNm de CXCL10 y de CXCL11 significativamente aumentados en muestras de pacientes celíacos al diagnóstico comparado con controles. Además, aquellos pacientes en DLG presentaron niveles comparables a los observados en controles. Por el contrario, CXCL9 no presentó diferencias entre los tres grupos estudiados. Estos resultados indican que existe una activa producción de CXCL10, y también de CXCL11, en duodeno de pacientes celíacos mientras consumen gluten, y la misma retorna a niveles basales cuando se excluye el gluten de la dieta.

Por otro lado, es interesante mencionar que los niveles de ARNm de CXCL10 y CXCL11 mostraron una marcada correlación positiva tanto en biopsias de pacientes con EC activa como en controles no celíacos (**Figura 20c**). CXCL9 en cambio, se observó siempre en niveles muy bajos de expresión y no correlacionados con ninguna de las otras dos quimoquinas (no mostrado).

Por lo tanto, estos resultados indican que en pacientes celíacos la ingesta de gluten es un fuerte inductor de la producción local de CXCL10 y CXCL11.

Correlación de la expresión de los ligandos de CXCR3 con IFN γ , IFN β y TNF α en mucosa intestinal

La expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 es modulada por diferentes factores solubles, entre los cuales se destacan IFN γ , IFN β y TNF α (Groom y Luster, 2011b). Con el fin de evaluar si existe una relación entre estas citoquinas y CXCL9, CXCL10 y CXCL11, se determinaron por PCR cuantitativa los niveles de ARNm de estos tres inductores en biopsias duodenales de pacientes y controles, utilizando las mismas muestras donde se estudiaron los niveles de expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (**Figura 21a**). Como era de esperar, los niveles de ARNm de IFN γ fueron significativamente elevados en pacientes al diagnóstico. Por lo contrario, los niveles de TNF α se observaron disminuidos en este grupo. Los niveles de IFN β mostraron una tendencia a estar elevados en el grupo con EC activa aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa.

Los niveles de ARNm de CXCL10 mostraron una correlación positiva significativa con los de IFN γ tanto en tejido proveniente de pacientes con EC activa como en controles (**Figura 21b**). Esta quimoquina no mostró correlación alguna con los niveles de expresión de IFN β ni de TNF α (no mostrado). Por el contrario, los niveles de ARNm de CXCL11 mostraron una correlación positiva significativa con los de IFN γ sólo en el grupo con EC activa y con los de IFN β en el grupo control (**Figura 21c**).

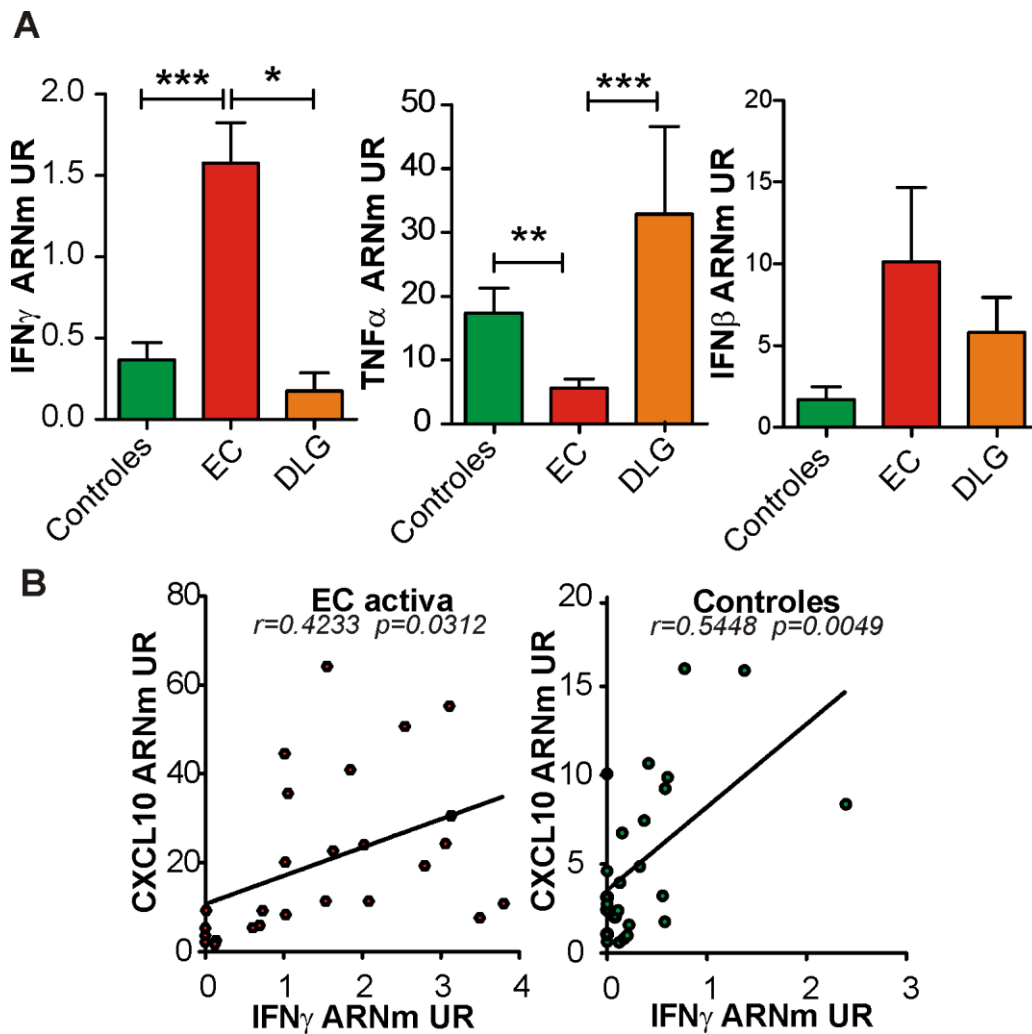


Figura 21. Análisis de correlación entre niveles de los ligandos de CXCR3 con IFN γ , IFN β y TNF α (Inicio). **A)** Los niveles de ARNm de IFN γ , IFN β y TNF α fueron determinados por PCR cuantitativa en biopsias duodenales del grupo de controles (n=25), pacientes con EC activa (n=26) y pacientes en DLG (n=6) previamente evaluados para los ligandos de CXCR3. Niveles referidos a β -actina, unidades relativas (UR). Test T no pareado. *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001. **B)** Análisis de correlación entre niveles de ARNm de CXCL10 e IFN γ en EC activa y en el grupo control. Test de correlación de Pearson. Se muestran los valores de r y p.

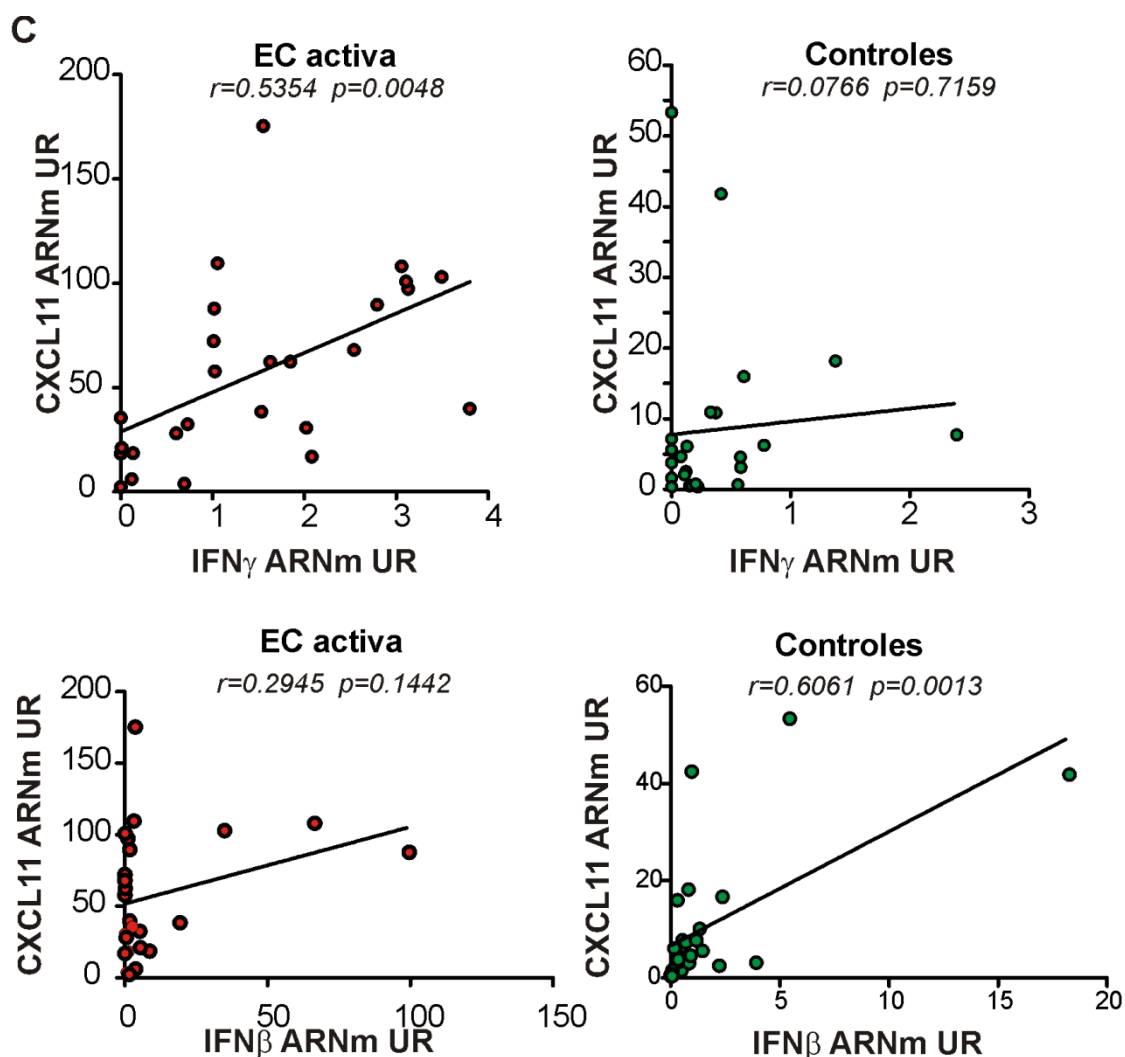


Figura 21. Análisis de correlación entre niveles de los ligandos de CXCR3 y IFN γ , IFN β y TNF α (Continuación) C) Análisis de correlación entre los niveles de ARNm de CXCL11 e IFN γ , y de CXCL11 con IFN β en pacientes con EC activa y en controles. Test de correlación de Pearson. Se muestran los valores de r y p .

Patrón de expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en mucosa duodenal y sus fuentes celulares

Con el fin de evaluar la expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en intestino delgado se realizaron estudios por microscopía confocal de fluorescencia en cortes de biopsias de duodeno (**Figura 22**). Se observó una escasa expresión de CXCL9, limitada a un muy bajo número de células aisladas en LP. El patrón fue similar en pacientes con EC activa y en controles. En contraste, se observó una abundante expresión de CXCL10 en mucosa duodenal con EC activa. Este patrón fue muy diferente al observado en controles o en pacientes en DLG, quienes presentaron a nivel de la LP sólo algunas células aisladas positivas para esta quimoquina. En el caso de inmunomarcación para

CXCL11, no se obtuvieron imágenes tan contrastantes entre duodeno control y con enteropatía. Si bien la expresión en celíacos al diagnóstico se encuentra aumentada, los niveles basales de expresión en los individuos controles (o en DLG, no mostrado) son más elevados comparados con los observados para CXCL10. Dado que la marca para CXCL10 y para CXCL11 se encuentra también por fuera de las células en el caso de celíacos, es decir en la matriz extracelular, no fue posible realizar un análisis cuantitativo mediante recuento de células positivas.

Es interesante resaltar que esta sobreproducción a nivel de duodeno en pacientes con EC activa es coherente con la elevada concentración sérica de CXCL10 encontrada en el suero de pacientes celíacos al diagnóstico. Por lo tanto, es posible inferir que la mucosa duodenal sería la principal fuente de CXCL10 circulante en pacientes que aún no han excluido el gluten de su dieta.

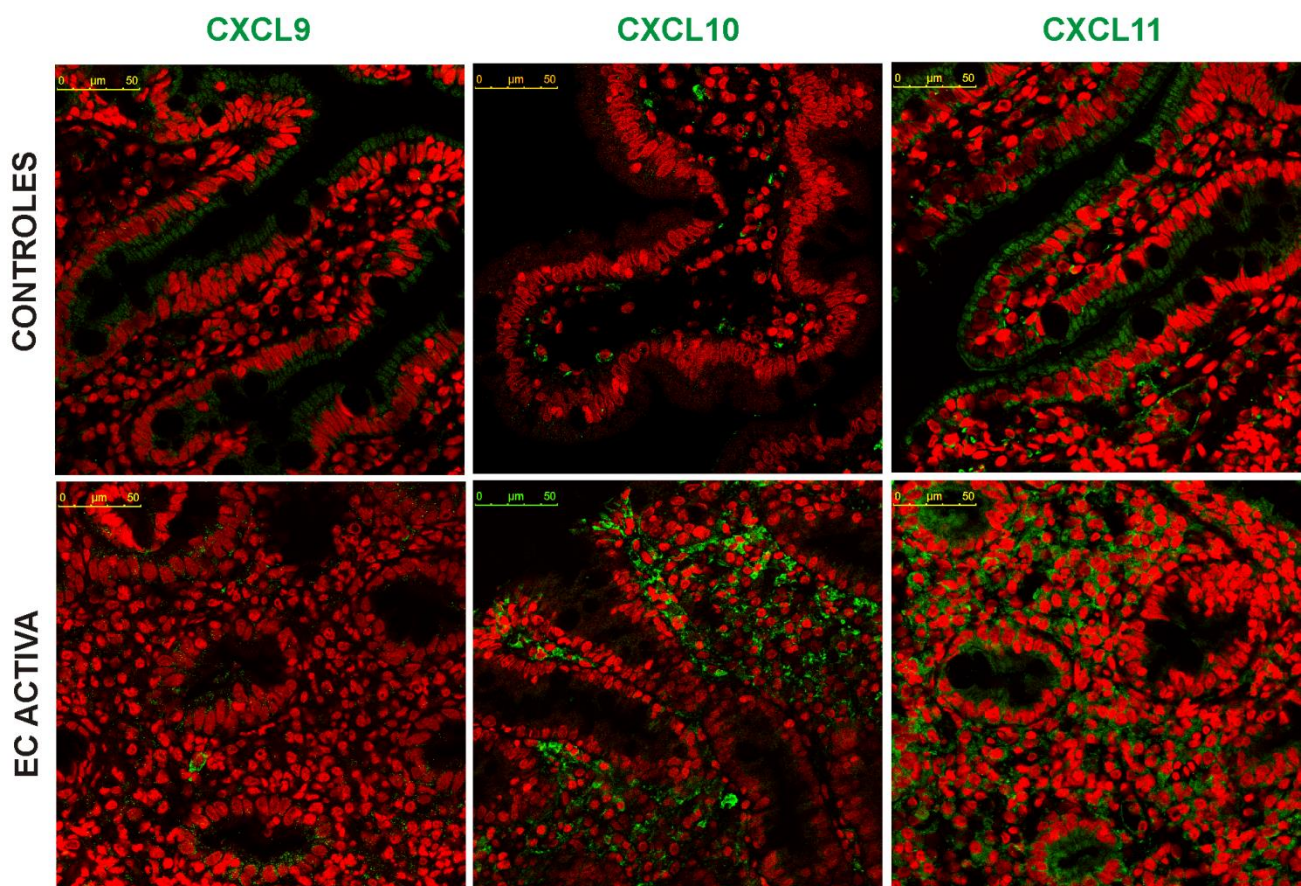


Figura 22. Expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en mucosa duodenal. Imágenes representativas del análisis por microscopía confocal de fluorescencia sobre biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico y controles. Se muestran CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (marcados en verde) y los núcleos (marcados en rojo). Objeto 63x, zoom de escaneo 1x.

Estos estudios permitieron realizar además un análisis detallado de las fuentes celulares de estas quimoquinas. Por su baja expresión, las fuentes de CXCL9 no fueron identificadas. Las imágenes de inmunofluorescencia revelaron marca de CXCL10 en enterocitos sólo en casos de pacientes con EC activa. Por el contrario, se observaron enterocitos CXCL11+ tanto en biopsias de pacientes con EC como en controles (Figura 23). Estos resultados sugieren que la producción de CXCL10 parece ser un fenómeno más específico de respuesta frente a la ingesta de gluten en pacientes celíacos.

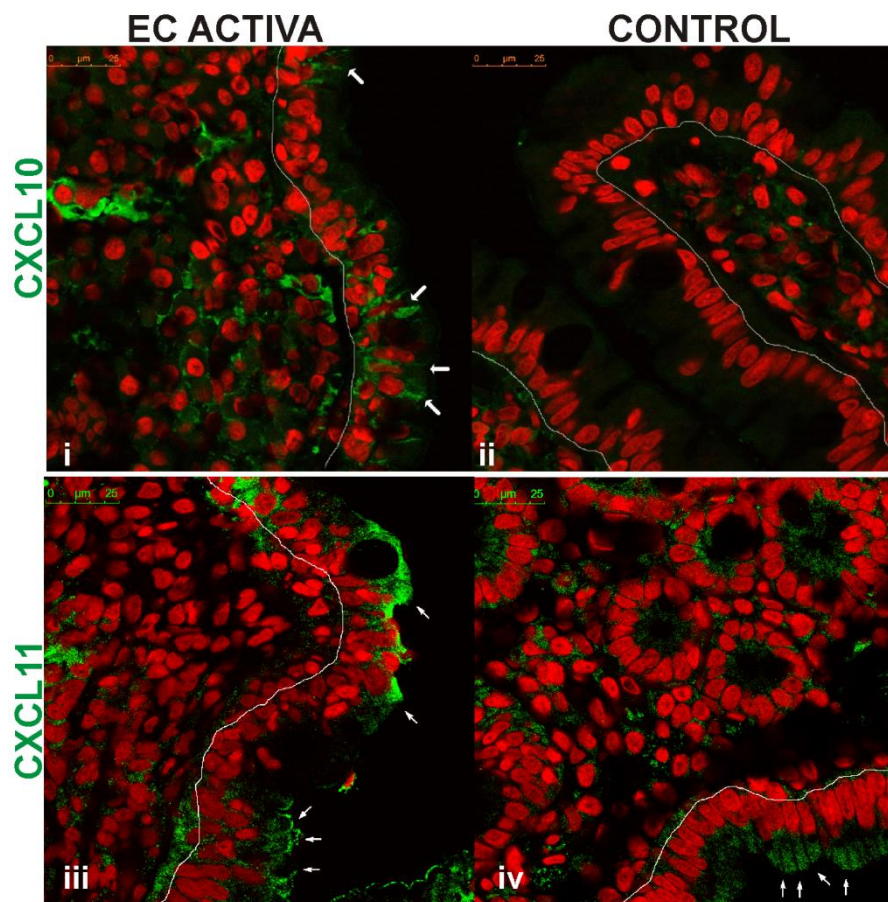


Figura 23. Expresión de CXCL10 y CXCL11 en epitelio duodenal. Análisis por microscopía de fluorescencia confocal sobre cortes de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico (i y iii) y controles (ii y iv). Se observan los núcleos en rojo y CXCL10 o CXCL11 en verde. Las flechas muestran enterocitos productores de quimoquina. Objetivo 63x, zoom escaneo 1,7x.

Dado que la enteropatía celíaca se caracteriza por un infiltrado masivo de linfocitos T y de células plasmáticas, evaluamos células CD3⁺ y células CD138⁺ como posibles fuentes de estas quimoquinas (Figuras 24 y 25). En el análisis de colocalización de CD3 y CXCL10 no observamos linfocitos T productores de CXCL10. Sin embargo, se observaron células CD138⁺ CXCL10⁺ en

abundancia en cortes de biopsias duodenales de pacientes con EC activa. Los pacientes en DLG y los individuos no celíacos presentaron también células plasmáticas CXCL10⁺ aunque en menor proporción. De manera análoga, en el caso de CXCL11, las imágenes no evidenciaron células CD3⁺ CXCL11⁺ pero sí células CD138⁺ CXCL11⁺ en mucosa duodenal tanto de pacientes como de controles. También se investigó la existencia de células HAM56⁺ para determinar si los macrófagos son productores de alguna de estas quimoquinas pero los resultados fueron negativos (imágenes no mostradas).

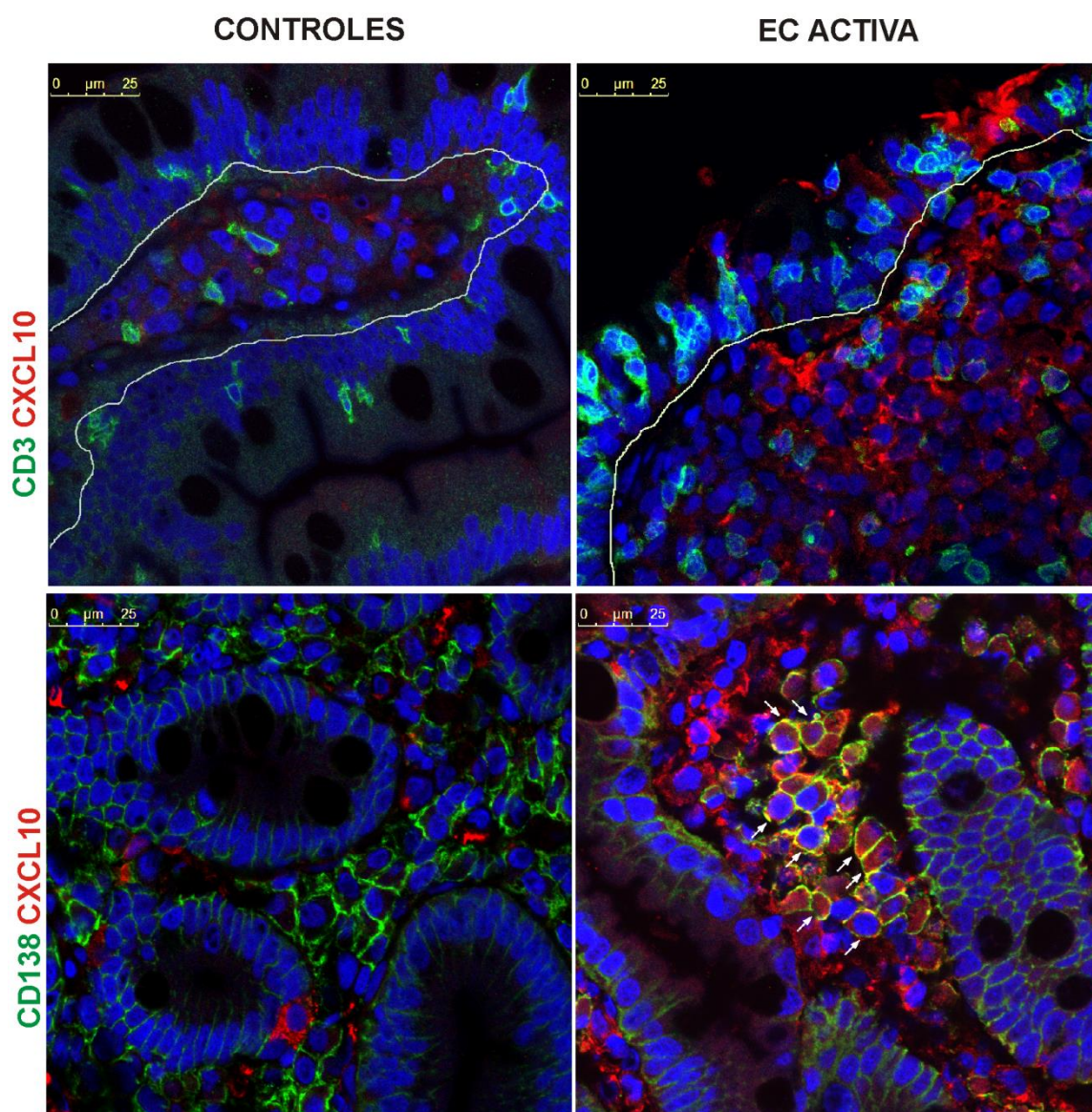


Figura 24. Producción de CXCL10 en la mucosa duodenal. Imágenes representativas del análisis por microscopía confocal de fluorescencia sobre cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes con EC activa y controles. Se realizó una doble marcación con CD3 o CD138 (verde) y CXCL10 (rojo). Los núcleos se observan en azul. Objetivo 63x, zoom escaneo 1,7x.

Estos resultados confirman la sobreproducción de CXCL10 en celíacos, y sugieren que las células plasmáticas serían las principales productoras de CXCL10 en LP. También indican que los enterocitos cumplirían un rol importante como productores de CXCL10 en el compartimento epitelial durante la enteropatía celíaca. Si bien CXCL11 también es producido en mucosa duodenal y comparte las fuentes de producción con CXCL10, su expresión no estaría limitada a la respuesta frente a la ingesta de gluten.

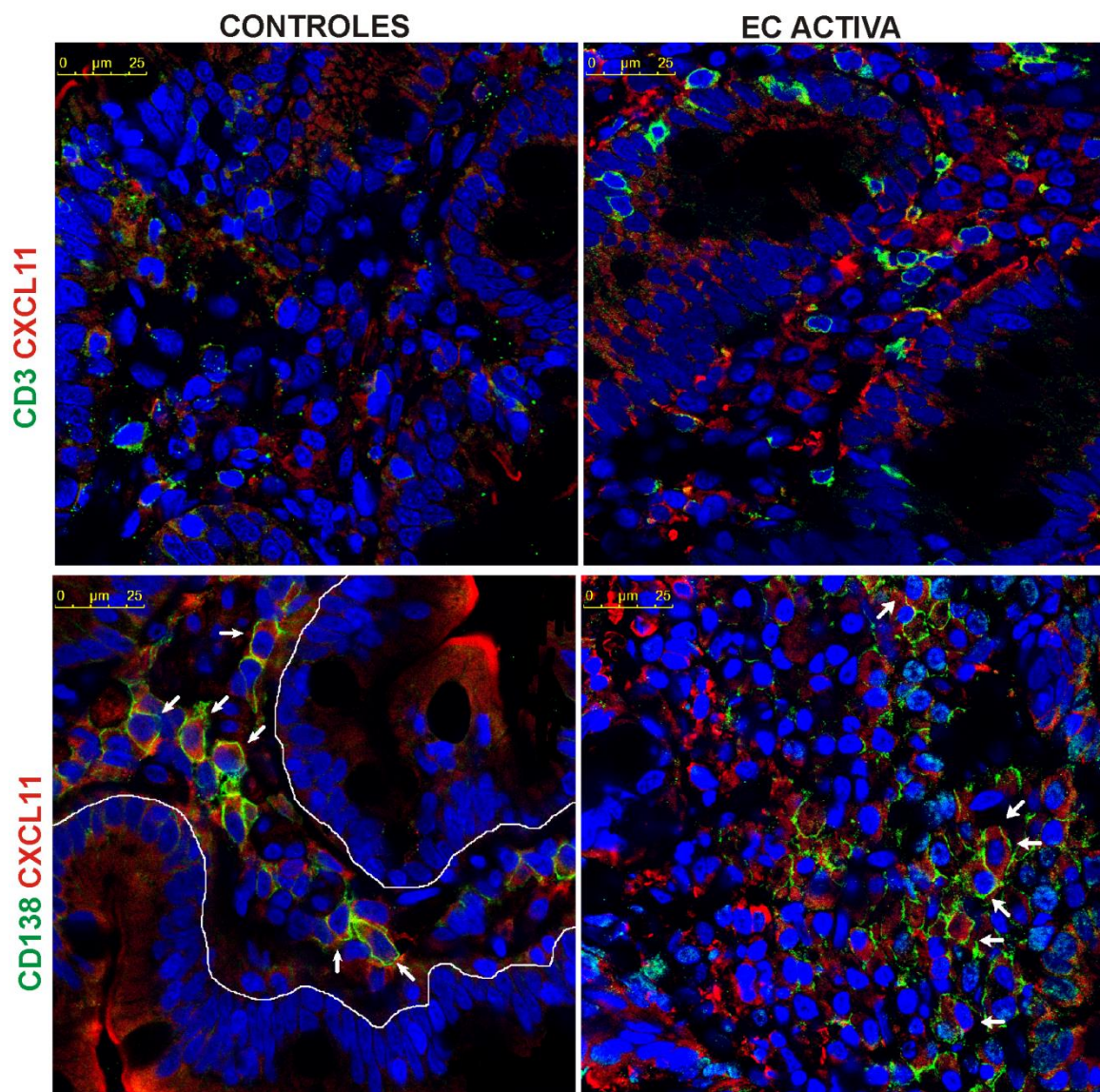


Figura 25. Producción de CXCL11 en la mucosa duodenal. Imágenes representativas del análisis por microscopía confocal de fluorescencia sobre cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes con EC activa y controles. Se realizó una doble marcación con CD3 o CD138 (verde) y CXCL11 (rojo). Los núcleos se observan en azul. Objetivo 63x, zoom escaneo 1,7x.

Las poblaciones linfocitarias que infiltran la LP en EC expresan CXCR3

Dado que el número de linfocitos T CD4⁺ Th1 está característicamente aumentado en la mucosa duodenal de pacientes con EC activa, y a su vez estas células expresan el receptor CXCR3, nuestra hipótesis planteó que la sobreproducción de CXCL10 (y también CXCL11) observada en la mucosa podría estar implicada en el reclutamiento de los linfocitos Th1 durante la enfermedad.

Para evaluarlo, analizamos la presencia de células CXCR3⁺ en biopsias duodenales de pacientes y controles por inmunofluorescencia y citometría de flujo (**Figuras 26 a 29**). Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal revelaron una importante presencia de células CXCR3⁺ en LP de pacientes celíacos al diagnóstico (**Figura 26a**). Realizando un recuento de células CXCR3⁺ en áreas de LP, observamos una mayor cantidad de estas células en el grupo con EC activa respecto a controles y a pacientes en DLG (**Figura 26b**).

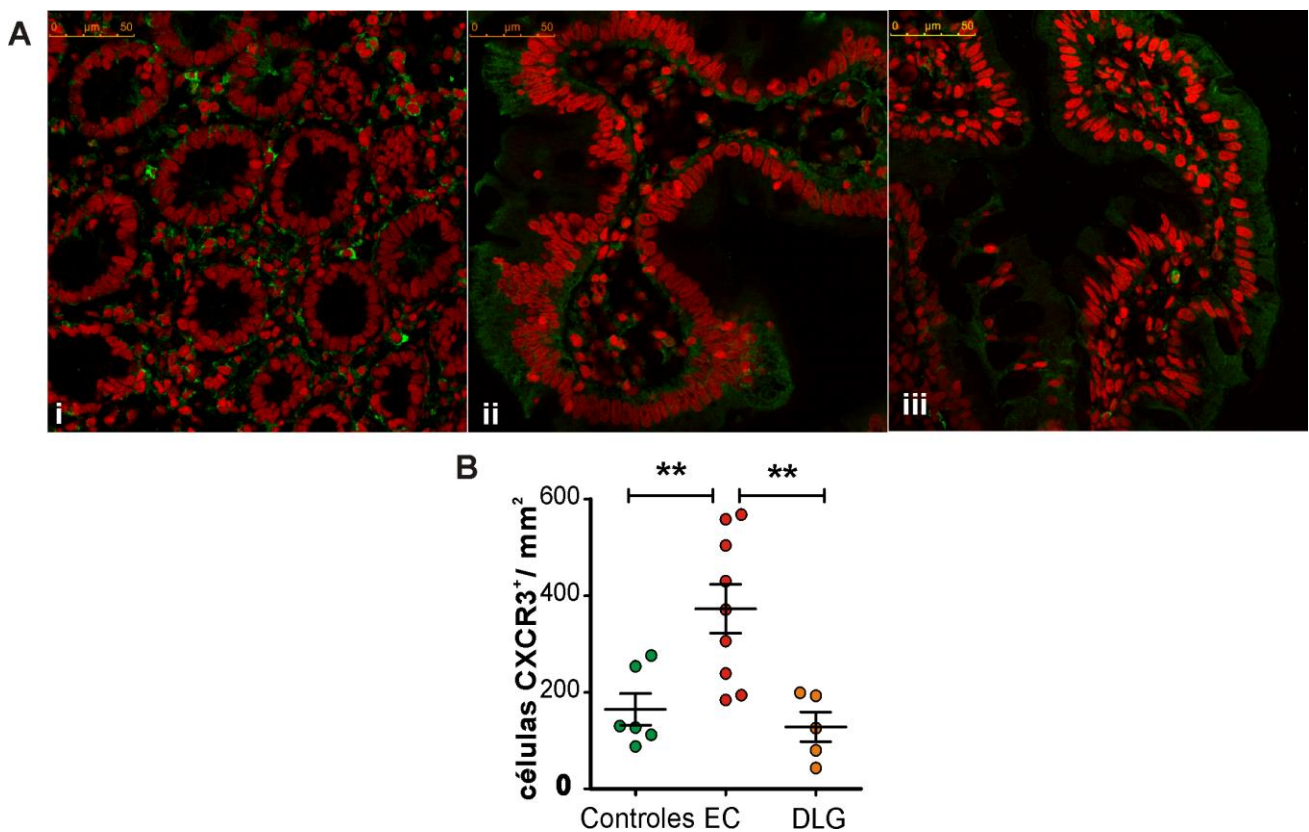


Figura 26. Recuento de células CXCR3⁺. **A)** Imágenes representativas del análisis por microscopía confocal de fluorescencia sobre cortes de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico (i), individuos control (ii) y pacientes en DLG (iii). Se observan células CXCR3⁺ en verde y núcleos en rojo. Objetivo 63x, zoom escaneo 1x. **B)** Recuento de células CXCR3⁺ por unidad de área en secciones de LP de los tres grupos de estudio. Test T no pareado; **p<0,01.

El hecho de que los pacientes en dieta presenten números similares de células CXCR3⁺ en LP a los encontrados en controles, sugiere que el efecto del gluten sería responsable de este reclutamiento activo de células CXCR3⁺ hacia la mucosa duodenal, y que la adherencia a una dieta estricta sin gluten restablece estos números a los observados en tejidos sanos.

Los linfocitos T y las células plasmáticas, son las dos poblaciones más numerosas que infiltran la LP en EC activa. Para evaluar si estas células son reclutadas en respuesta a la activación del eje CXCR3/CXCL10, se aislaron células a partir de biopsias duodenales y se estudiaron por citometría de flujo. Se observó que prácticamente todas las células CD138⁺ expresan CXCR3 (**Figura 27a**). Además, si bien se analizaron pocas muestras y la estadística no mostró diferencias significativas, la comparación entre individuos controles y pacientes con EC activa reveló claramente una mayor cantidad de estas células en la LP. Dentro de la población de linfocitos CD3⁺CD4⁺ también observamos expresión de CXCR3 (**Figura 27b**). El análisis cuantitativo mostró, como era de esperar, una mayor proporción de estas células en la LP de pacientes celíacos (**Figura 27c**), y lo mismo para la población CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺. A su vez, dentro de la población infiltrante CD3⁺CD4⁺, se observó una mayor proporción de células positivas para CXCR3 en el grupo con EC activa. Finalmente, la población CD3⁺CD4⁻, presumiblemente CD8⁺, presentó resultados análogos en cuanto a mayor presencia relativa en EC que en controles, a excepción de que dentro de esta subpoblación la presencia de CXCR3 no resultó ser predominante en EC (**Figura 27d**).

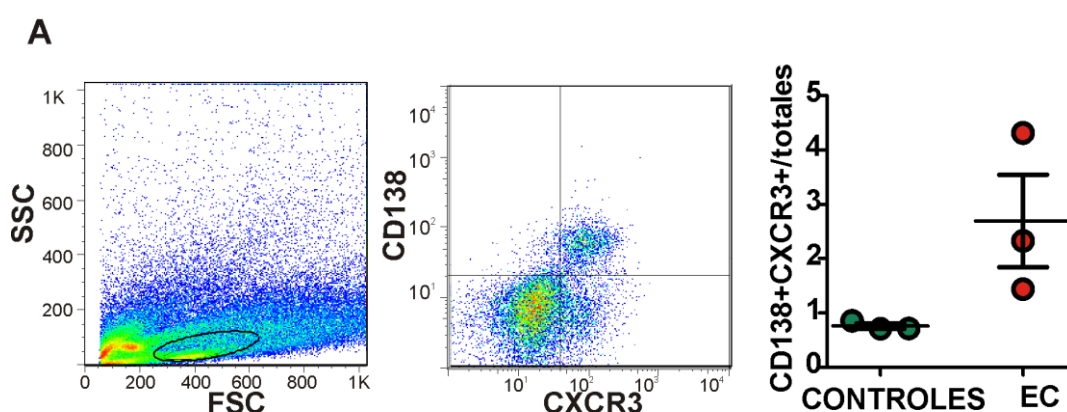


Figura 27. Caracterización de las células CXCR3⁺ en LP (Inicio). A) Análisis representativo de células de LP aisladas de biopsias duodenales obtenidas de un paciente celíaco y analizadas por citometría de flujo. Se muestran células CD138⁺ que expresan CXCR3 y el estudio cuantitativo comparativo entre muestras de celíacos al diagnóstico y controles (cantidades porcentuales de células CD138⁺CXCR3⁺ respecto al total de células, Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas).

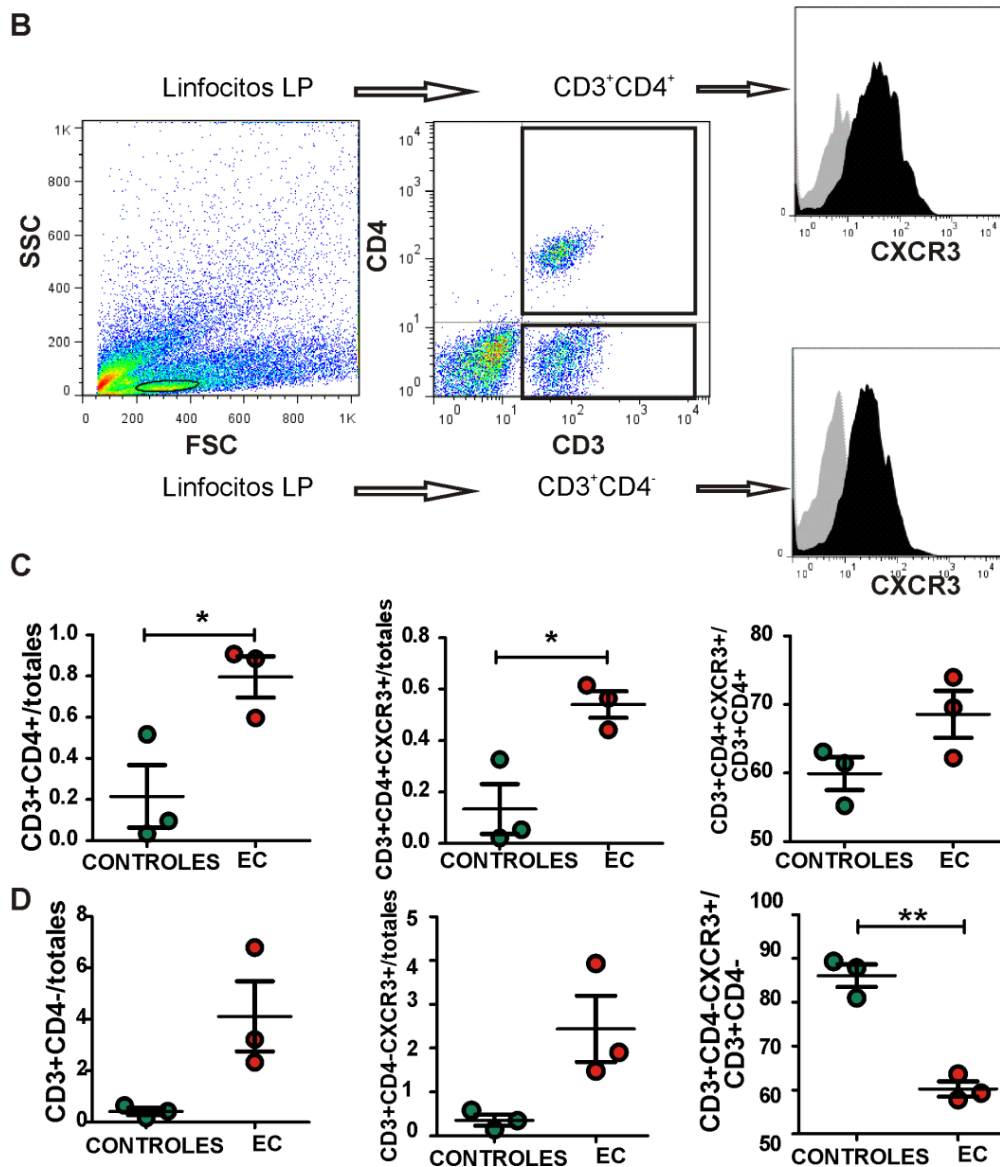


Figura 27. Caracterización de las células CXCR3⁺ en LP (Continuación). **B)** Análisis representativo de células de LP aisladas de biopsias duodenales obtenidas de un paciente celíaco y analizadas por citometría de flujo. Se muestran células CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD4⁻ que expresan CXCR3. **C)** Análisis cuantitativo comparando entre controles y celíacos las cantidades porcentuales en el compartimento de LP de células CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺ respecto a células totales. También se muestra la proporción de células CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺ en la población CD3⁺CD4⁺. Test T no pareado; *p<0,05. **D)** Análisis cuantitativo comparando entre controles y celíacos las cantidades porcentuales en el compartimento de LP de células CD3⁺CD4⁻ o CD3⁺CD4⁻CXCR3⁺ respecto a células totales. También se muestra la proporción de células CD3⁺CD4⁻CXCR3⁺ en la población CD3⁺CD4⁻. Test T no pareado, **p<0,01.

Todos estos resultados en su conjunto sugieren una activa participación del eje CXCR3/CXCL10 en el reclutamiento de las poblaciones linfocitarias más relevantes en EC hacia la mucosa duodenal.

Expresión de CXCR3 en la población de linfocitos intraepiteliales

Como se ha mencionado, el aumento de LIEs es un marcador característico en EC activa. Nos propusimos evaluar si el eje de CXCR3 podría estar involucrado en un reclutamiento selectivo de estas células. En primer lugar se realizaron estudios por microscopía confocal sobre secciones de biopsias duodenales. Las imágenes de fluorescencia evidenciaron la presencia de células CXCR3⁺ en el compartimento intraepitelial. De manera característica estas células fueron más frecuentemente encontradas en celíacos no tratados que en controles (**Figura 28**).

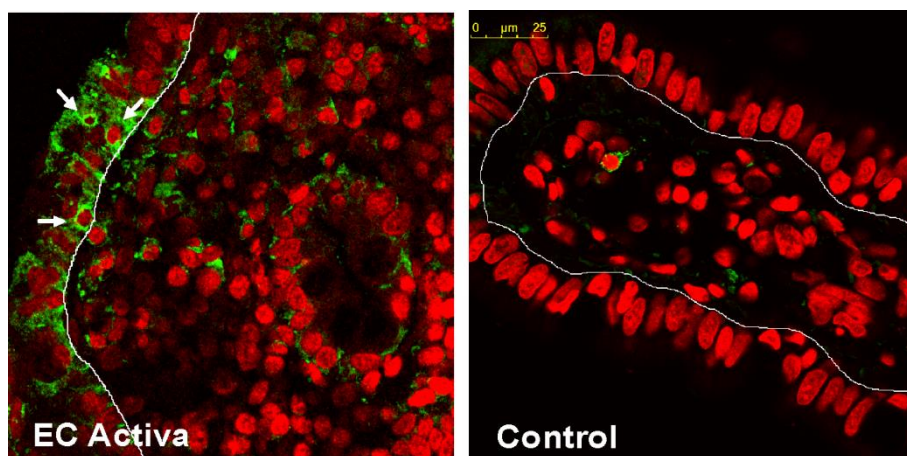


Figura 28. Análisis por microscopía confocal de las células CXCR3⁺ en el compartimento intraepitelial. Imágenes representativas del análisis de la expresión de CXCR3 por microscopía confocal sobre cortes histológicos de biopsias duodenales de un paciente celíaco y un control. Las flechas señalan células CXCR3⁺ del compartimento intraepitelial (verde). Núcleos marcados en rojo. Objetivo 63x, zoom escaneo 1,7x.

En segundo lugar realizamos estudios por citometría de flujo, para lo cual incorporamos el marcador CD103, el cual se expresa en los LIEs (aunque no de manera exclusiva) y es útil para su caracterización. Los resultados de estos análisis sobre las células aisladas del compartimento epitelial de biopsias duodenales confirmó la presencia de LIEs CD3⁺CD103⁺CXCR3⁺ (**Figura 29a**). El análisis cuantitativo comparando celíacos con controles mostró, como era de esperar, una mayor presencia de células CD3⁺CD103⁺ en este compartimento y mayor presencia de CD3⁺CD103⁺CXCR3⁺, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Llamativamente, las células CXCR3⁺ dentro de la población CD3⁺CD103⁺ representan una menor proporción en celíacos que en controles (**Figura 29b**).

Estos resultados sugieren que la producción de CXCL10 por parte de los enterocitos sería responsable del reclutamiento de linfocitos CXCR3⁺ hacia el compartimento intraepitelial. Como hemos mencionado, aunque CXCL11 también es expresado en la mucosa, CXCL10 nos resulta más interesante ya que sus señales de inducción parecen depender directamente de la ingesta de gluten o más genéricamente, de un estado inflamatorio.

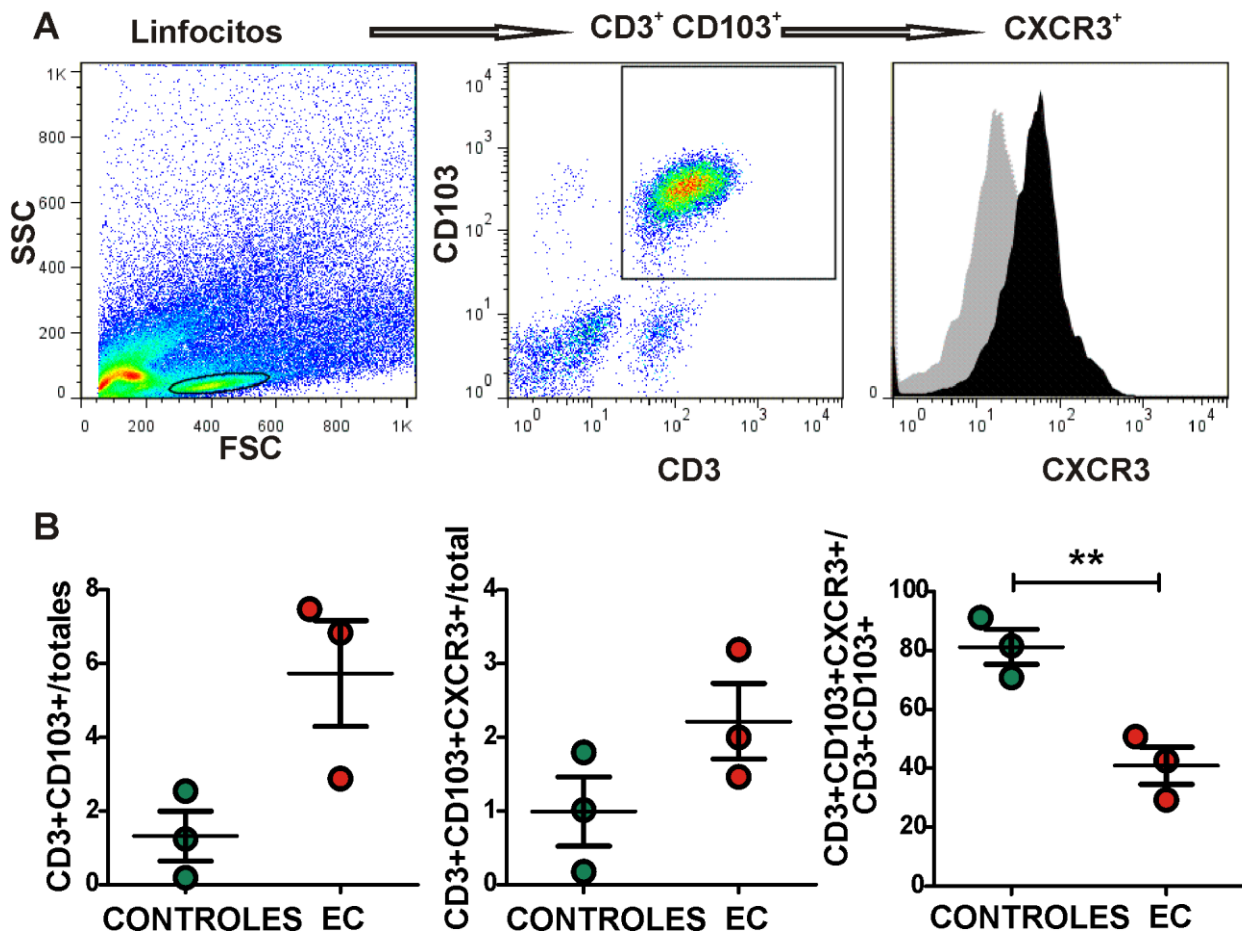


Figura 29. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CXCR3 en células aisladas del compartimento intraepitelial. A) Citometría de flujo representativa correspondiente a la fracción epitelial proveniente de la digestión de biopsias duodenales de un paciente celíaco. Se muestran células CD3⁺CD103⁺CXCR3⁺. B) Análisis cuantitativo comparando entre controles y celíacos las cantidades porcentuales en el compartimento epitelial de células CD3⁺CD103⁺ o CD3⁺CD103⁺CXCR3⁺. Los porcentajes son respecto a células totales. También se muestra la proporción de células CD3⁺CD103⁺CXCR3⁺ en la población CD3⁺CD103⁺. Test T no pareado, **p<0,01.

Análisis de la inducción *in vitro* de los ligandos de CXCR3 en biopsias duodenales: respuesta a poly I:C, IL-15 o p31-43

Las infecciones virales y la citoquina IL-15, han sido sugeridos como disparadores de los mecanismos de daño que ocurren a nivel de la mucosa duodenal en etapas tempranas de la EC (Sollid y Jabri, 2013). En las infecciones virales, la respuesta innata genera una serie de señales que pueden, en parte, ser modeladas por el ligando sintético poly I:C. Por otro lado, el péptido derivado de α -gliadina, p31-43, ha sido señalado como disparador de mecanismos innatos en la mucosa intestinal (Maiuri et al., 2003). En este sentido, nos propusimos evaluar si estos estímulos pueden modular la expresión de los ligandos de CXCR3. Con este fin, biopsias duodenales de controles y de pacientes con EC activa se incubaron en presencia o ausencia de poly I:C, IL-15 o p31-43 .

Efecto de poly I:C

El estímulo con poly I:C indujo un incremento en los niveles de ARNm de CXCL10 y CXCL11 en muestras de la población control, mientras que los resultados fueron más heterogéneos en las muestras de población celíaca (**Figura 30**). Es conocido que poly I:C induce CXCL10 en diferentes sistemas experimentales *in vitro*. Nuestros resultados indican que la mucosa intestinal de tejido sano responde rápidamente al estímulo con poly I:C produciendo CXCL10 y CXCL11. En cambio, la inducción de las quimoquinas no se observa en el caso de muestras con enteropatía, posiblemente debido a que los mecanismos de inducción se encuentran ya sobre-activados. En el caso de CXCL9, no se observaron cambios en ninguna de las dos poblaciones.

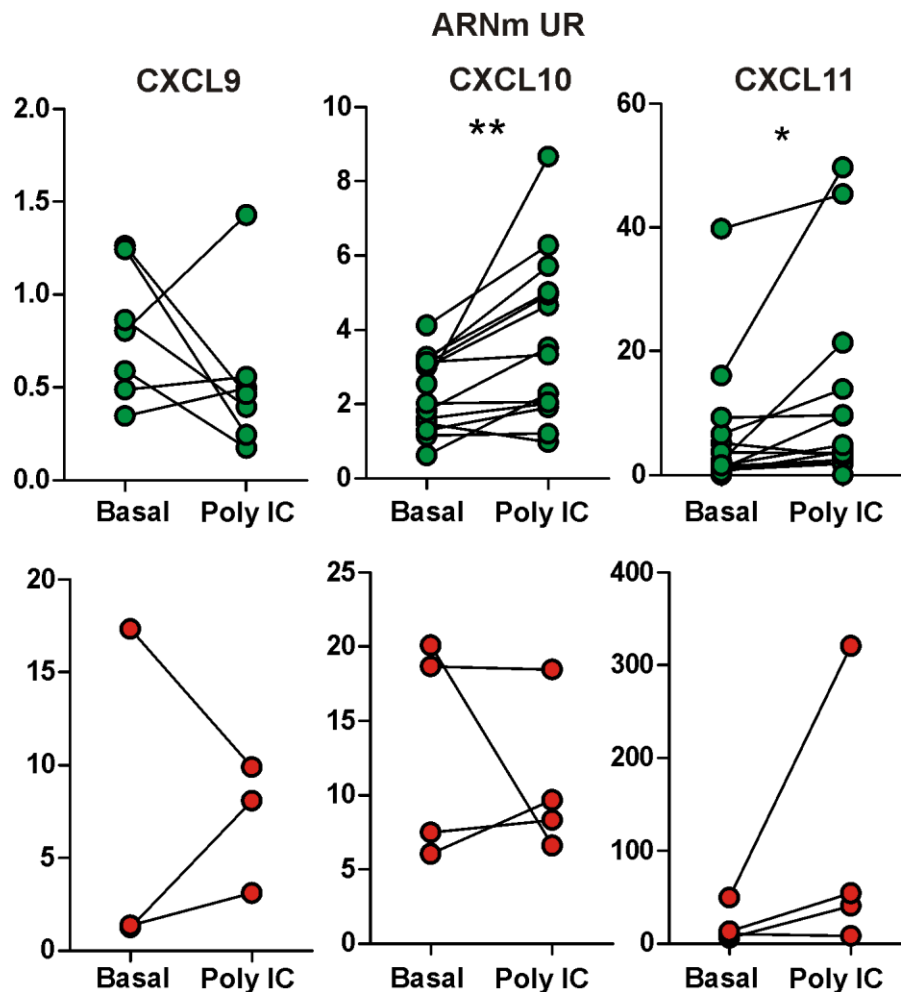


Figura 30. Inducción de la expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 por poly I:C. Análisis por PCR cuantitativa de la inducción *in vitro* de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en piezas biopsias duodenales de individuos controles (círculos verdes) y de pacientes celíacos al diagnóstico (círculos rojo) incubadas con medio solo (basal) o con poly I:C (100 µg/ml) durante 3 horas. Unidades relativas (UR) de ARNm de cada quimocina, niveles referidos a β-actina. Test T pareado; *p<0,05 **p<0,01.

Efecto de IL-15

Cuando las biopsias se incubaron en presencia de IL-15, CXCL9 y CXCL11 no presentaron cambios significativos en su expresión. Sin embargo, se observó una inducción en los niveles de ARNm de CXCL10 en el grupo control, y no en el celíaco (**Figura 31**). Al igual que en el caso de la estimulación con poly I:C, podríamos inferir que, al ser la mucosa celíaca un tejido sobreestimulado por su condición inflamatoria crónica, los posibles efectos de la adición *ex vivo* de estos estímulos no disparan nuevas inducciones. Sin embargo, este resultado muestra que existiría una conexión directa entre IL-15 y CXCL10 en duodeno. Evaluando el efecto de IL-15 sobre CXCL10 a 24 horas no observamos diferencias respecto al basal en ninguno de los dos grupos (no mostrado).

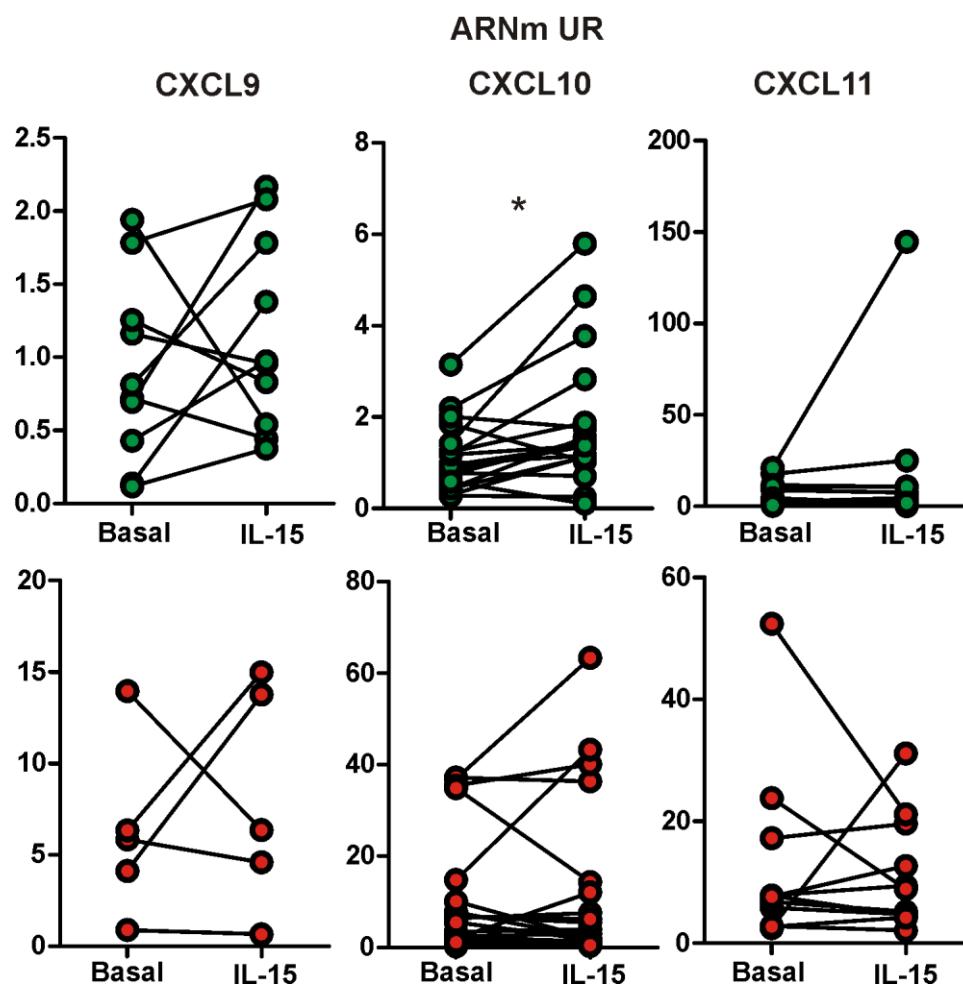


Figura 31. Inducción de la expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 por IL-15. Análisis por PCR cuantitativa de la inducción *in vitro* de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en piezas biopsias duodenales de individuos controles (círculos verdes) y de pacientes celíacos al diagnóstico (círculos rojo) incubadas con medio solo (basal) o con IL-15 (50 ng/ml) durante 3 horas. Unidades relativas (UR) de ARNm de cada quimoquina, niveles referidos a β-actina. Test T pareado; *p<0,05.

Ante estos resultados, nos pareció interesante estudiar la relación funcional entre IL-15 y CXCL10. Dado que el control de la expresión de IL-15 es muy complejo, ya que esta puede ser almacenada y transpresentada asociada a su receptor, nos propusimos evaluar la relación entre la expresión de CXCL10 y los niveles del receptor de IL-15 (IL-15Rα). Para esto se analizaron por PCR cuantitativa, los niveles de ARNm de CXCL10 e IL-15Rα en biopsias de pacientes celíacos al diagnóstico, pacientes en DLG e individuos no celíacos. Los resultados mostraron un mayor nivel de IL-15Rα en individuos controles (**Figura 32a**). Es de destacar, que se observó una correlación positiva y significativa con CXCL10 en el grupo control, pero no en celíacos (**Figura 32b y c**). Al estudiar los niveles de ARNm de IL-15 en las mismas biopsias, encontramos niveles mayores en controles que en celíacos (**Figura 32d**). El patrón de correlación entre IL-15 y CXCL10 no fue

significativo en ninguno de los dos grupos pero es interesante destacar que presentó tendencias opuestas (Figura 32e y f). Hay que remarcar que los niveles de ARNm no reflejan la actividad biológica de IL-15. De hecho, se han observado altos niveles de este transcrito de manera constitutiva en tejidos no inflamados (Fehniger y Caligiuri, 2001). Las determinaciones de IL-15 a nivel de proteína son técnicamente difíciles de realizar y esto, en parte, ha conducido a la enorme discrepancia de resultados que se encuentran en la bibliografía.

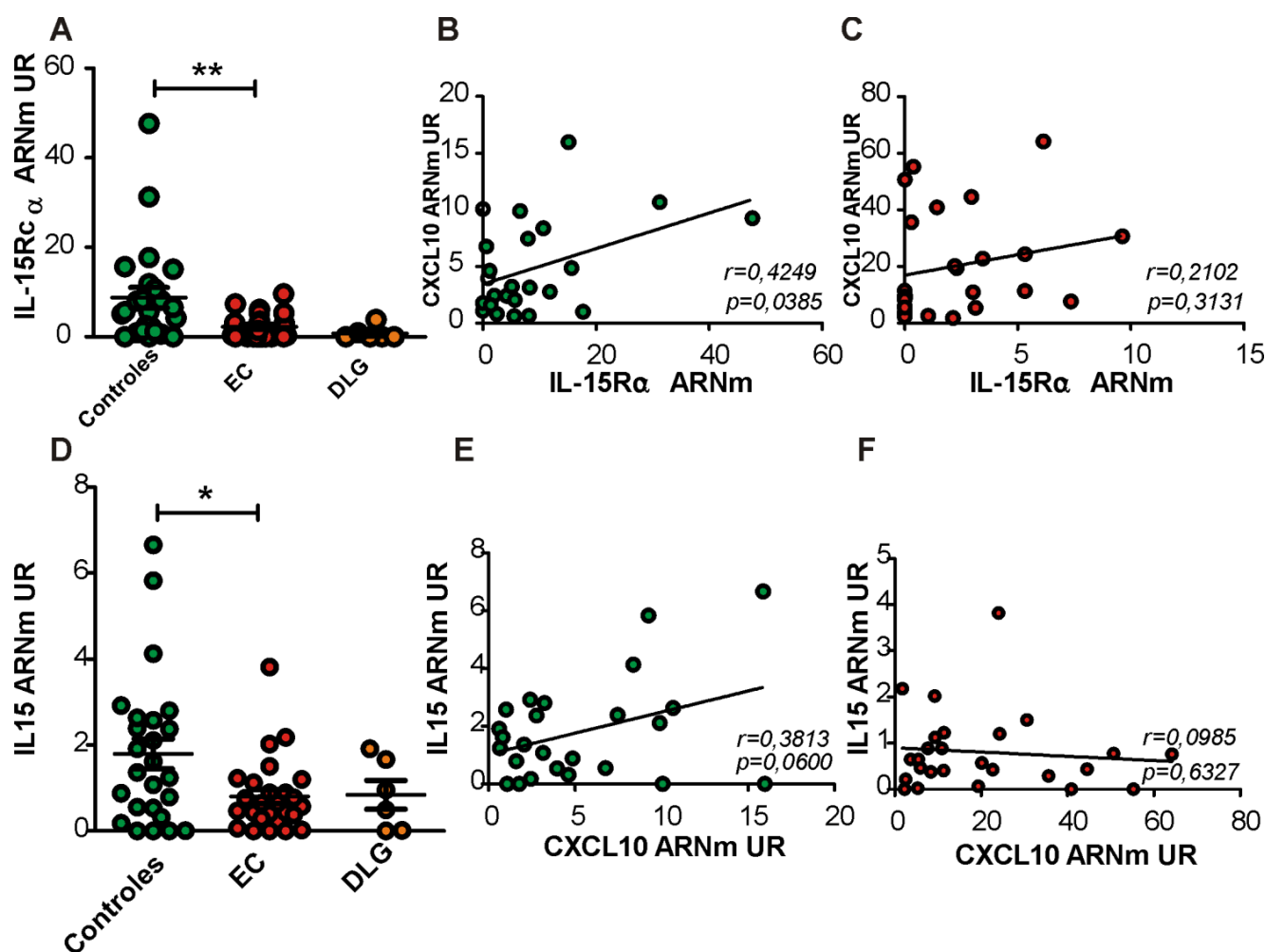


Figura 32. Relación entre IL-15, IL15Rα y CXCL10. A) Evaluación de los niveles de ARNm de IL-15Rα en biopsias duodenales de controles (n=25), pacientes con EC activa (n=26) y pacientes en DLG (n=6) por PCR cuantitativa. Niveles referidos a β-actina, unidades relativas (UR). Test T no pareado, **p<0,01. B y C) Correlación entre los niveles de ARNm de IL-15Rα y CXCL10 en controles (círculos verdes) y celíacos (círculos rojos). Test de correlación de Pearson. D) Evaluación de los niveles de ARNm de IL-15 en biopsias duodenales de individuos controles, pacientes con EC activa y pacientes en DLG por PCR cuantitativa (Test T no pareado, *p<0,05). E y F) Correlación de los niveles de ARNm de IL-15Rα y CXCL10 en controles (círculos verdes) y celíacos (círculos rojos). Test de correlación de Pearson.

En algunos tipos celulares, especialmente LIEs, IL-15 es capaz de inducir la expresión de IFN γ (Fehniger y Caligiuri, 2001; Mention et al., 2003). Determinando por PCR cuantitativa los niveles de IFN γ en biopsias duodenales incubadas en presencia de IL-15 durante 3 horas, observamos una tendencia hacia mayores niveles de expresión tanto en el grupo con EC activa como en controles (**Figura 33a**). Las condiciones del ensayo no nos permiten dilucidar si el aumento en la expresión de CXCL10 producido por IL-15 en biopsias controles es mediado, al menos parcialmente, por un aumento en la expresión de IFN γ . Por otro lado, se estima que IFN γ puede inducir la expresión de IL-15 a nivel transcripcional (Fehniger y Caligiuri, 2001). En biopsias duodenales de tejido normal observamos una correlación positiva entre los niveles de ARNm IFN γ e IL-15, distinto al caso de muestras con EC activa, donde no se observó ninguna relación clara (**Figura 33b**). Esto podría reflejar una regulación a nivel transcripcional de IL-15 más notoria en el tejido sano, mientras que en la enteropatía claramente predominan mecanismos post-transcripcionales y post-traduccionales de la citoquina.

Otro aspecto analizado fue la relación entre los niveles de mensajero de IL-15R α y de IFN γ , los cuales presentaron correlación positiva en el grupo con EC y no en controles (**Figura 33c**). Probablemente este hecho sea consecuencia de poblaciones celulares como LIEs (quienes expresan IL-15R α) incrementadas en EC, capaces de producir IFN γ en un entorno con elevada IL-15 (Di Sabatino et al., 2006).

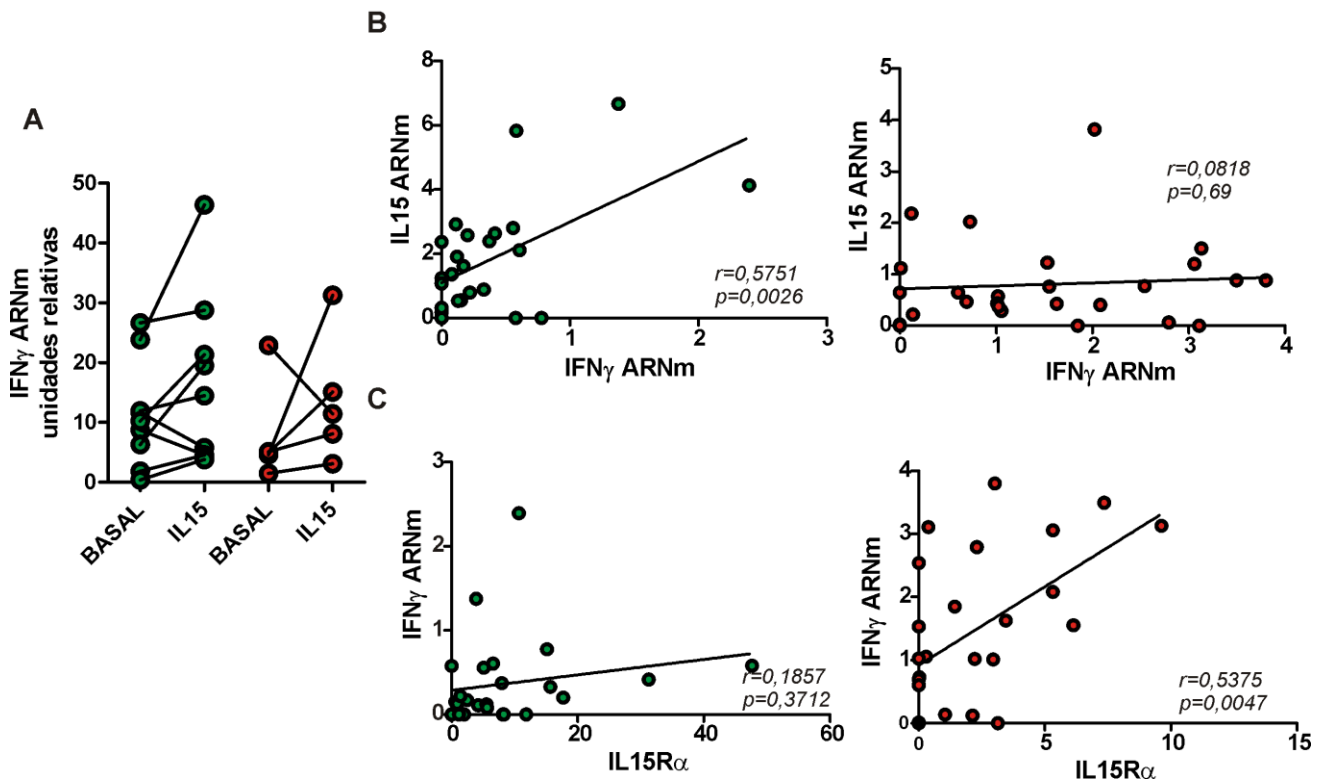


Figura 33. Inducción de IFN γ por IL-15 y relación del eje IL-15 con IFN γ . **A)** Determinación de los niveles de ARNm de IFN γ en biopsias duodenales de individuos control (círculos en verde) o de pacientes celíacos al diagnóstico (círculos en rojo) incubadas en presencia de IL-15 (50 ng/ml) o medio solo (basal) durante tres horas. No se observaron diferencias significativas. Test T pareado. **B y C)** Se muestran los niveles de correlación entre los niveles de ARNm de IL-15 o IL-15R α , respectivamente, con IFN γ en controles (círculos en verde) y en pacientes celíacos al diagnóstico (círculos en rojo). Test de correlación de Pearson.

Efecto del p31-43

El último de los tres estímulos estudiados fue el péptido derivado de α -gliadina, p31-43. La incubación de piezas de biopsias duodenales de controles durante tres horas con este péptido no indujo cambios en los niveles de ARNm de CXCL10. Similares resultados se observaron para CXCL9, y CXCL11. En biopsias provenientes de pacientes con EC activa se observó, llamativamente, una caída significativa en los niveles de ARNm de CXCL10. Algo similar ocurrió con CXCL11, aunque de forma menos marcada. CXCL9 no presentó diferencias en su expresión ante el estímulo (**Figura 34**).

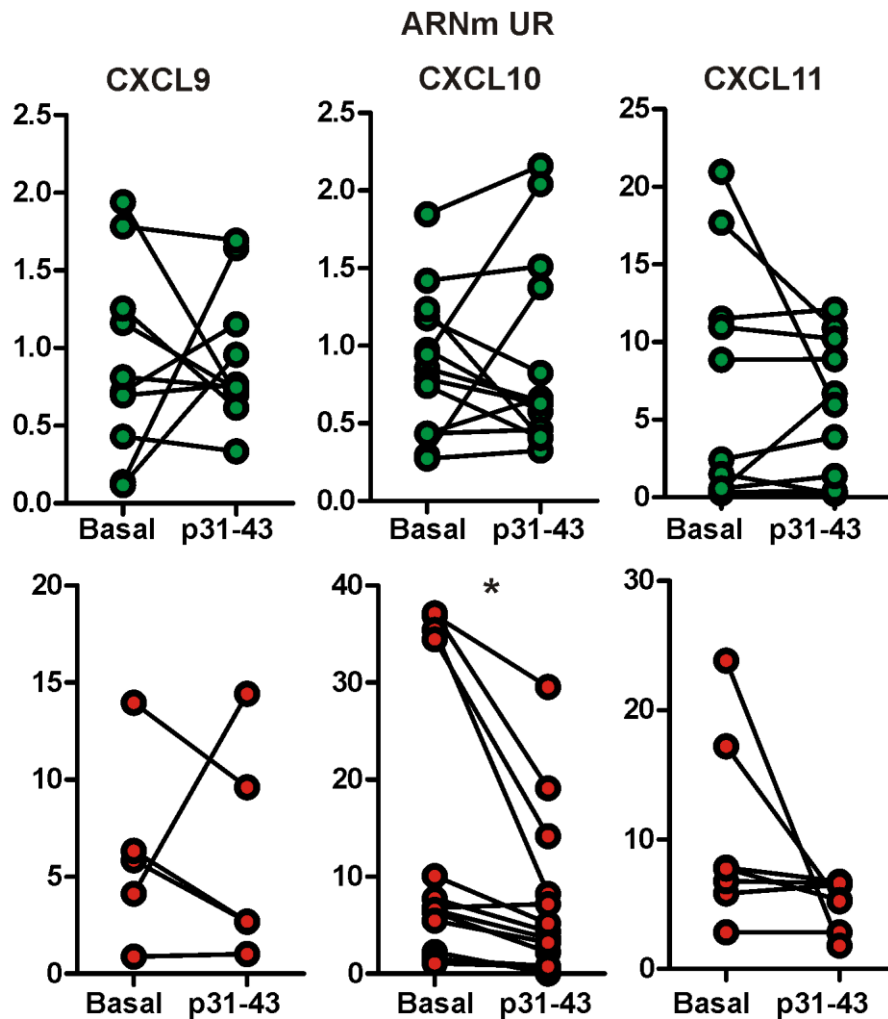


Figura 34 Inducción de la expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 por p31-43. Análisis por PCR cuantitativa de la inducción *in vitro* de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en piezas biopsias duodenales de individuos controles (círculos verdes) y de pacientes celíacos al diagnóstico (círculos rojo) incubadas con medio solo (basal) o con p31-43 durante 3 horas (100 µg/ml). Unidades relativas (UR) de ARNm de cada quimoquina, niveles referidos a β -actina. Test T pareado; * $p < 0,05$.

Esta disminución en la expresión de CXCL10 resultó ser un efecto específico de este péptido, dado que no se observó cuando las biopsias fueron incubadas en presencia de otro péptido derivado de gliadinas, el 8-mer, de secuencia diferente (Figura 35a). Por otro lado, cuando la incubación con p31-43 se realizó a 24 horas, la tendencia permaneció, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 35b).

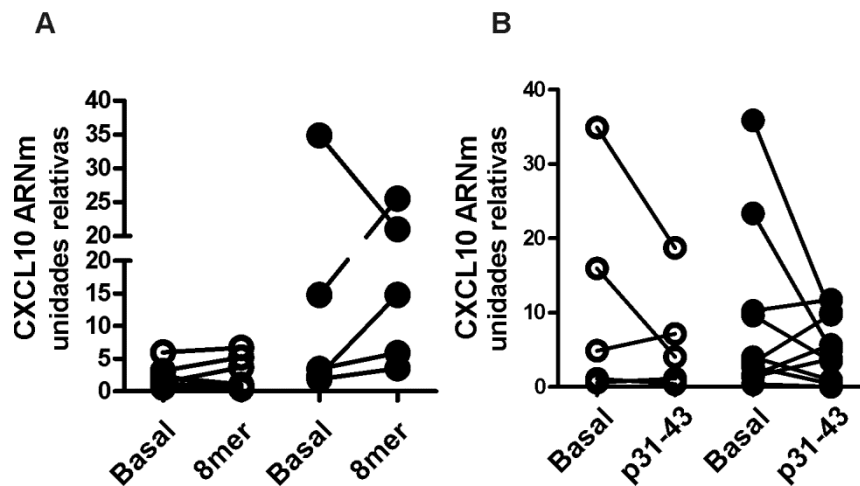


Figura 35. Expresión de CXCL10 en duodeno post-estimulación con péptidos de gliadina. Determinación de los niveles de ARNm de CXCL10 en biopsias duodenales de individuos control (círculos blancos) o de pacientes celíacos sin tratar (círculos negros) incubadas con medio solo (basal) y en presencia del péptido 8mer (100 µg/ml) (A) durante tres horas; o en presencia del péptido p31-43 (100 µg/ml) (B) durante 24 horas. Niveles referidos a β -actina. No se observaron diferencias significativas. Test T pareado.

Estudios previos reportan que el p31-43 es capaz de inducir IL-15 (Maiuri et al., 2003; Barone et al., 2011). En este sentido, procedimos a evaluar la expresión de esta citoquina a nivel de ARNm en las biopsias estimuladas con el p31-43, tanto a 3 como a 24 horas. Si bien pudimos observar una tendencia hacia niveles mayores de IL-15 en el grupo control a las 24 horas, los resultados no mostraron una modulación de IL-15 significativa por parte del p31-43 (Figura 36). Finalmente, evaluamos si el p31-43 tenía efecto sobre la expresión de $IFN\gamma$. Con este fin, se evaluaron los niveles de ARNm de $IFN\gamma$ en biopsias duodenales estimuladas con p31-43 por 3 horas. En la Figura 37, se observa un efecto inhibitorio en la expresión de $IFN\gamma$ en el grupo celíaco, aunque las diferencias no fueron significativas. En el grupo control, no se observaron diferencias.

Es interesante destacar que, si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa, los niveles de ARNm de CXCL11 tendieron a ser menores que el basal luego de la incubación con p31-43 durante 3 horas, lo que sugiere un comportamiento similar al observado para CXCL10.

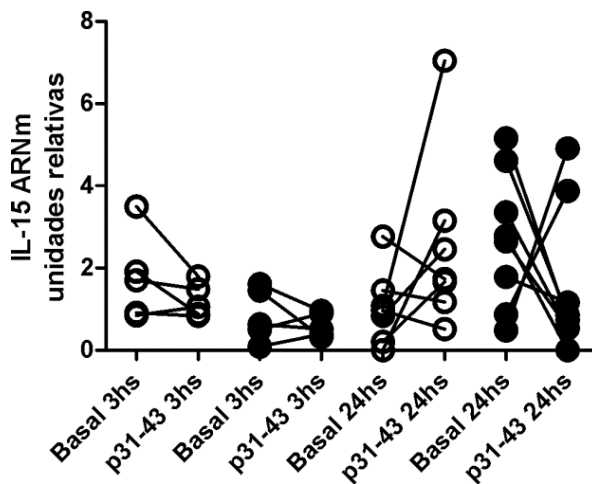


Figura 36. Efecto del p31-43 en la expresión de IL-15 en duodeno. Determinación de los niveles de IL-15 ARNm en biopsias duodenales de individuos control (círculos blancos) o de pacientes celíacos sin tratar (círculos negros) incubadas con medio solo (basal) y en presencia del péptido p31-43 durante 3 o 24 horas. Niveles referidos a β -actina. No se observaron diferencias significativas. Test T pareado.

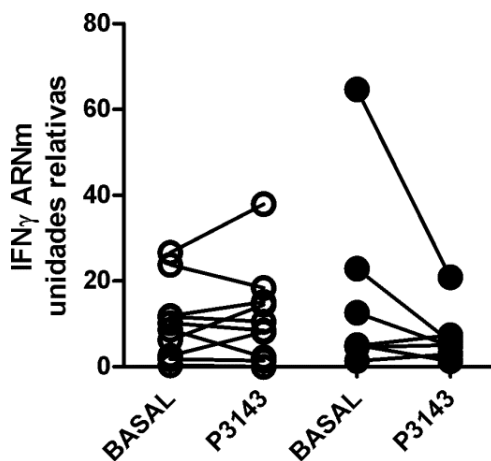


Figura 37. Efecto del p31-43 en la expresión de IFN γ en duodeno. Determinación de los niveles de ARNm de IFN γ en biopsias duodenales de individuos control (círculos blancos) o de pacientes celíacos al diagnóstico (círculos negros) incubadas en presencia o ausencia del péptido p31-43 durante tres horas. Niveles referidos a β -actina. No se observaron diferencias significativas. Test T pareado.

En conjunto, estos resultados sugieren que la inducción de mediadores mediante la incubación *ex vivo* con p31-43 u otros estímulos en piezas con enteropatía severa, puede estar inhibida ya que algunas vías de señalización están sobre-activadas. De esta manera, no se observarían cambios en los niveles de expresión de los mediadores proinflamatorios estudiados.

Análisis de la expresión de CXCL10 en líneas celulares

Dado que en biopsias duodenales hemos observado distintos efectos sobre la expresión de CXCL10 generados por IL-15, por poly I:C o por p31-43, procedimos a evaluar la expresión de esta quimioquina y de los otros ligandos de CXCR3 en líneas celulares sometidas a estos estímulos.

Análisis de la inducción de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en células Caco-2:

Nuestro interés fue evaluar la línea celular Caco-2 ya que es el modelo *in vitro* más usado de enterocitos humanos. Habiendo observado efectos estimulatorios sobre los niveles de ARNm de CXCL10 en biopsias de individuos control con IL-15 y con poly I:C, se cultivaron células Caco-2 en presencia o no de esos moduladores, así como también de IFN γ , y se determinaron los niveles de CXCL10 por PCR cuantitativa (**Figura 38a**). Los resultados revelaron que la incubación de células Caco-2 con IL-15 o poly I:C durante 3h no provoca un cambio de expresión de CXCL10. Por el contrario, IFN γ , un conocido inductor de los ligandos de CXCR3, indujo la expresión de CXCL10 de forma significativa. Esto implicaría que los efectos observados en biopsia entera no se deberían a una respuesta directa a nivel del enterocito frente a IL-15 o poly I:C.

Como el p31-43 mostró efectos diferentes en piezas de pacientes celíacos al diagnóstico y controles, nos interesó evaluar si el p31-43 induce la expresión de CXCL10 en células Caco-2. Para esto, se comparó el efecto del p31-43 con el de un péptido no relacionado (PNR), usado como control, así como también con IFN γ y poly I:C. Las medidas se realizaron luego de 6 horas de incubación (**Figura 38b**). Se observó que tanto IFN γ como poly I:C indujeron la expresión de CXCL10, pero el p31-43 no tuvo efecto. Es de notar que, mientras hubo una rápida respuesta frente al IFN γ , el efecto de poly I:C solo se observó luego de 6 de incubación. Esto sugiere que la inducción de CXCL10 por poly I:C requiere la activación de vías de señalización adicionales.

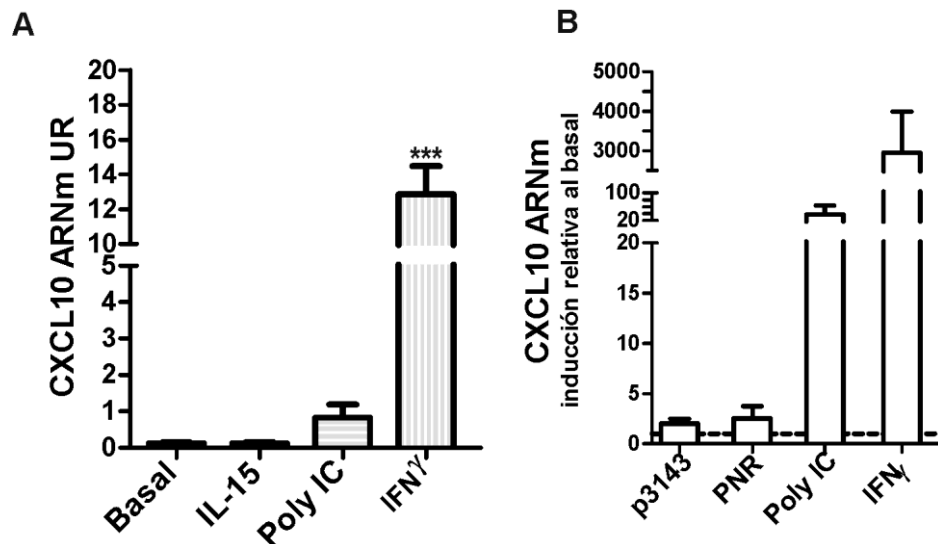


Figura 38. Inducción de CXCL10 en células Caco-2 por IL-15, poly I:C o IFN γ . **A)** Determinación de los niveles de ARNm de CXCL10 en células Caco-2 incubadas en presencia de IL-15 (50 ng/ml), poly I:C (100 μ g/ml), IFN γ (50 ng/ml) o medio de cultivo solo (basal), durante 3 horas. Niveles referidos a β -actina, unidades relativas (UR). Test T *** $p < 0,001$. **B)** Determinación de los niveles de ARNm de CXCL10 en células Caco-2 incubadas en presencia del péptido p31-43 (100 μ g/ml), un péptido control no relacionado (PNR, 100 μ g/ml), IFN γ (50 ng/ml), poly I:C (100 μ g/ml) o medio solo (basal), durante 6 horas. Niveles de expresión relativos al basal. Test T para muestra única, diferencias estadísticamente no significativas.

El mismo análisis se realizó sobre la expresión de los otros dos ligandos de CXCR3, CXCL9 y CXCL11, en células Caco-2 estimuladas. El análisis por PCR cuantitativa mostró el mismo comportamiento de CXCL11 que el observado para CXCL10 con respecto a la inducción por IFN γ y a la cinética observada con poly I:C. En cambio, CXCL9 fue inducido sólo por IFN γ , demostrando una vez más las diferencias de esta quimoquina con CXCL10 y CXCL11 (**Figura 39**).

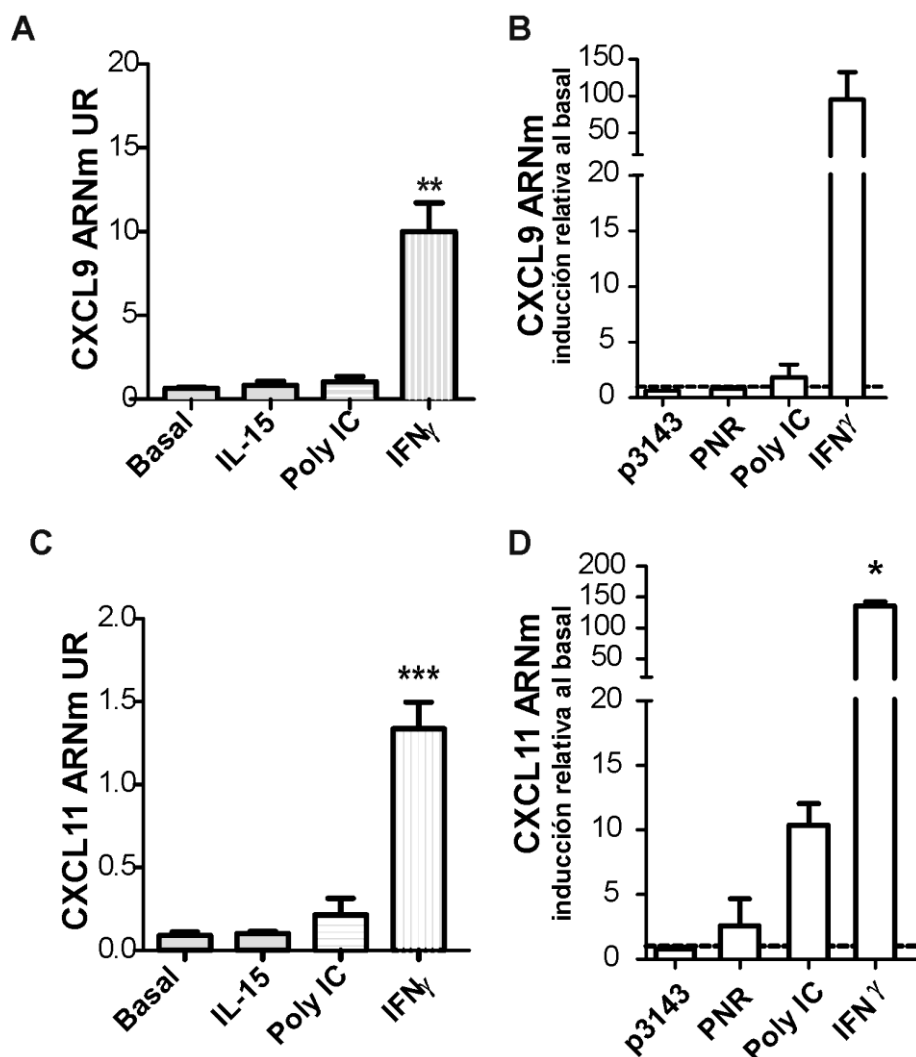


Figura 39. Inducción de CXCL9 y CXCL11 en células Caco-2 por IL-15, poly I:C o IFN γ . Determinación de los niveles de ARNm de CXCL9 (A) y de CXCL11 (C) en células Caco-2 incubadas en presencia de IL-15 (50 ng/ml), poly I:C (100 μg/ml), IFN γ (50 ng/ml) o medio de cultivo solo (basal) durante 3 horas. Niveles referidos a β-actina, unidades relativas (UR). Test T; **p<0,01, ***p<0,001. Determinación de los niveles de ARNm CXCL9 (B) y de CXCL11 (D) en células Caco-2 incubadas en presencia del péptido p31-43 (100 μg/ml), un péptido control no relacionado (PNR, 100 μg/ml), IFN γ (50 ng/ml), poly I:C (100 μg/ml) o medio solo durante 6 horas. Niveles de expresión relativos al basal. Test T para muestra única, *p<0,05.

Para caracterizar el efecto del p31-43, y también de otros inductores como IFN γ y poly I:C, sobre la expresión de CXCL10 a nivel de proteína en esta línea derivada de enterocito humano, se realizaron cultivos durante 24 horas seguidos de ensayos de citometría de flujo (Figura 40a) y de inmunofluorescencia indirecta (Figura 40b). El análisis por citometría de flujo mostró un aumento de expresión de CXCL10 inducido por el p31-43 de magnitud similar al observado por poly I:C o IFN γ . El recuento de células CXCL10⁺ realizado por inmunofluorescencia confirmó esta inducción a nivel de proteína por parte del péptido p31-43. En este ensayo también fue incluido el PNR, a modo de

control negativo. A pesar de no observar aumento de CXCL10 a nivel de ARNm a 6 horas post-estímulo, el análisis por citometría de flujo e inmunofluorescencia mostró inducción de CXCL10 a nivel de proteína. Estos estudios *in vitro* sobre una línea modelo de enterocito son de relevancia ya que sugieren que *in vivo* el epitelio podría responder a la presencia de p31-43 con producción de CXCL10.

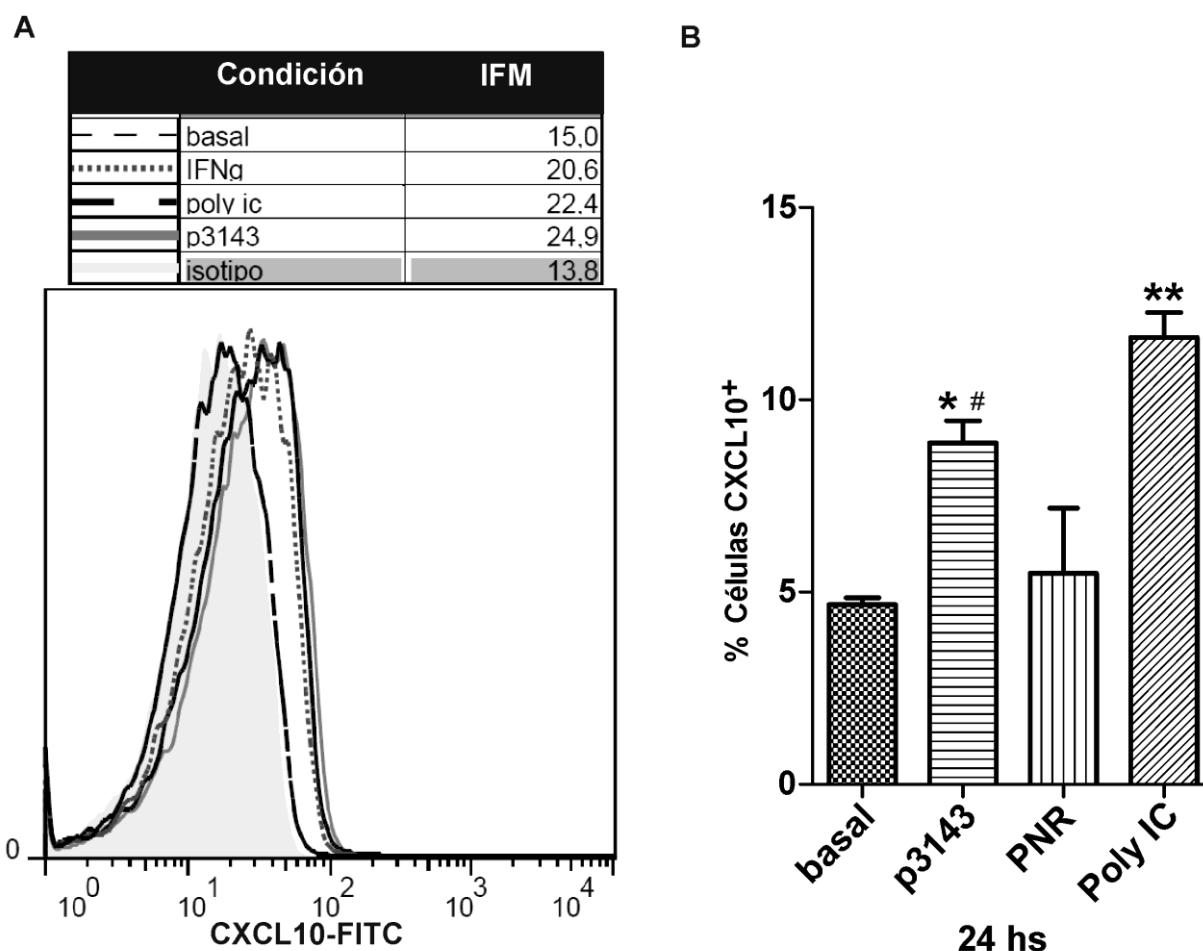


Figura 40. Inducción de CXCL10 en células Caco-2 por p31-43. **A)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de CXCL10 en células Caco-2 incubadas en presencia de p31-43 (100 μ g/ml), poly I:C (100 μ g/ml), IFN γ (50 ng/ml) o medio de cultivo solo (basal) durante 24 horas. En la tabla se describen los valores de intensidad media de fluorescencia. **B)** Recuento de células Caco-2 CXCL10⁺ por inmunofluorescencia indirecta previamente incubadas en presencia o ausencia de p31-43, PNR, o poly I:C (todos a la concentración de 100 μ g/ml) durante 24 horas. Se expresan los resultados como porcentaje de células positivas. Test T no pareado, se muestran las diferencias respecto al basal: * p <0,05; **<0,01; y respecto a PNR: # p <0,05.

Análisis de la inducción de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en células modelo de monocitos, linfocito B y linfocitos T:

Para ampliar el estudio de la expresión de los ligandos de CXCR3 a otros tipos celulares de interés en la mucosa intestinal, se realizaron los estudios de estimulación *in vitro* sobre células Daudi, una

línea celular de linfocitos B. Esta línea celular fue seleccionada ante la presencia de células plasmáticas productoras de CXCL10 y de CXCL11 en la mucosa duodenal. Dado que en biopsias de población control se observó una inducción a las 3 horas por IL-15 para CXCL10 y por poly I:C para CXCL10 y para CXCL11, se realizaron incubaciones a 3 horas con esos estímulos y con IFN γ (Figura 41a). Sorprendentemente, se observó en las tres quimoquinas un efecto inhibitorio en estas células ante la presencia de IL-15. Asimismo, también poly I:C provocó una disminución significativa en la expresión de CXCL9 y CXCL10 ARNm. Por su parte, IFN γ no indujo cambios.

Para evaluar el efecto del p31-43, se realizó el esquema de incubación a 6 horas utilizando p31-43, PNR, IFN γ y poly I:C (Figura 41b). No se observaron cambios en la expresión de ninguna de las quimoquinas ante la presencia del péptido, ni tampoco con IFN γ . Sin embargo CXCL10 experimentó una inducción significativa en presencia de poly I:C.

Estos resultados implican que si bien existe una baja respuesta de esta línea celular hacia los estímulos estudiados, la misma es capaz de producir CXCL10 en respuesta a la incubación con poly I:C.

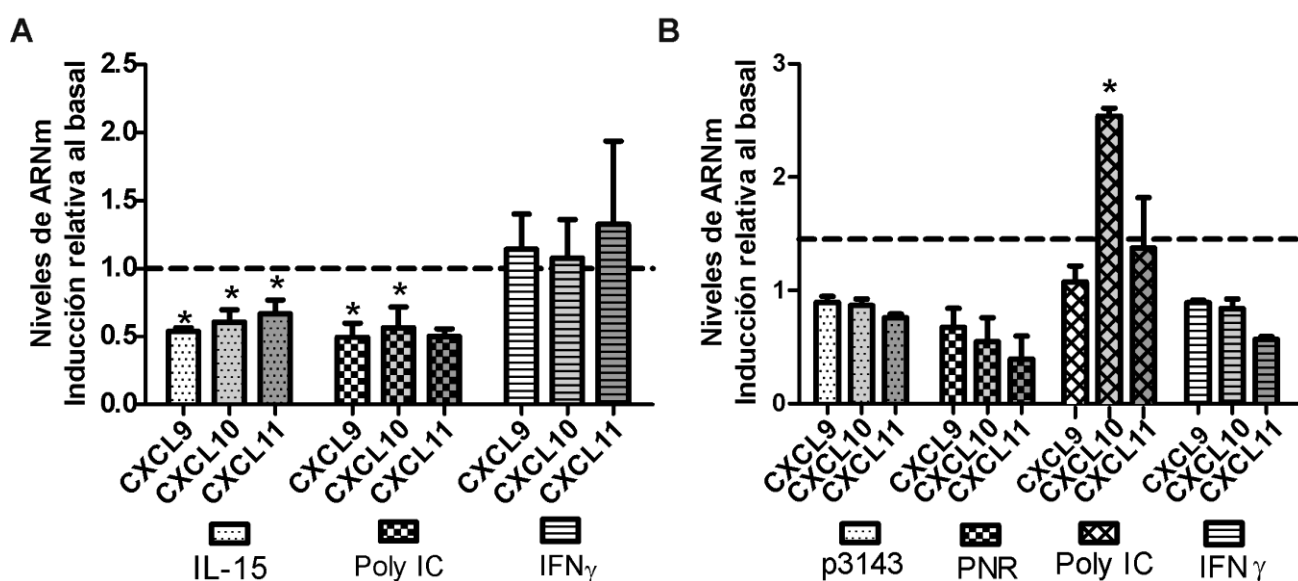


Figura 41. Análisis de la expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en células Daudi. A) Determinación de los niveles de ARNm de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en células Daudi incubadas en presencia de IL-15 (50 ng/ml), poly I:C (100 μ g/ml) o IFN γ (50 ng/ml) durante 3 horas. Se muestra la expresión relativa al basal. Test T para muestra única; *p<0,05. **B)** Determinación de los niveles de ARNm de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en células Daudi incubadas en presencia del péptido p31-43, PNR (ambos a 100 μ g/ml), IFN γ (50 ng/ml) o poly I:C (100 μ g/ml) durante 6 horas. Se muestra la expresión relativa al basal. Test T para muestra única, *p<0,05.

Otras células como los linfocitos T y los macrófagos han sido descritas como productoras de ligandos de CXCR3. A pesar de no haber evidenciado en biopsias la presencia de macrófagos o linfocitos T productores de estas quimoquinas, realizamos estudios de estimulación durante 6 horas con p31-43, PNR, poly I:C o IFN γ sobre células de la línea monocítica THP-1 y células de la línea T Jurkat (Figura 42). En las células THP-1, se observó un incremento en los niveles de ARNm de CXCL10 y de CXCL11 cuando fueron tratadas con IFN γ o con poly I:C, aunque hay que remarcar que la respuesta en CXCL10 fue más acentuada. El p31-43 no produjo cambios. En esta línea celular la expresión de CXCL9 fue no detectable a excepción del tratamiento con IFN γ (no mostrado).

En las células Jurkat, si bien se observaron niveles de ARNm más elevados de CXCL10 y CXCL11 respecto al basal en el caso de las células estimuladas con p31-43, los mismos no difirieron de aquellos niveles observados con el péptido control, PNR. En cambio, sí hubo inducción de CXCL10 en las fosas tratadas con IFN γ y poly I:C, y de CXCL11 en aquellas tratadas con poly I:C. La expresión de CXCL9 no fue detectable a excepción del tratamiento con poly I:C (no mostrado).

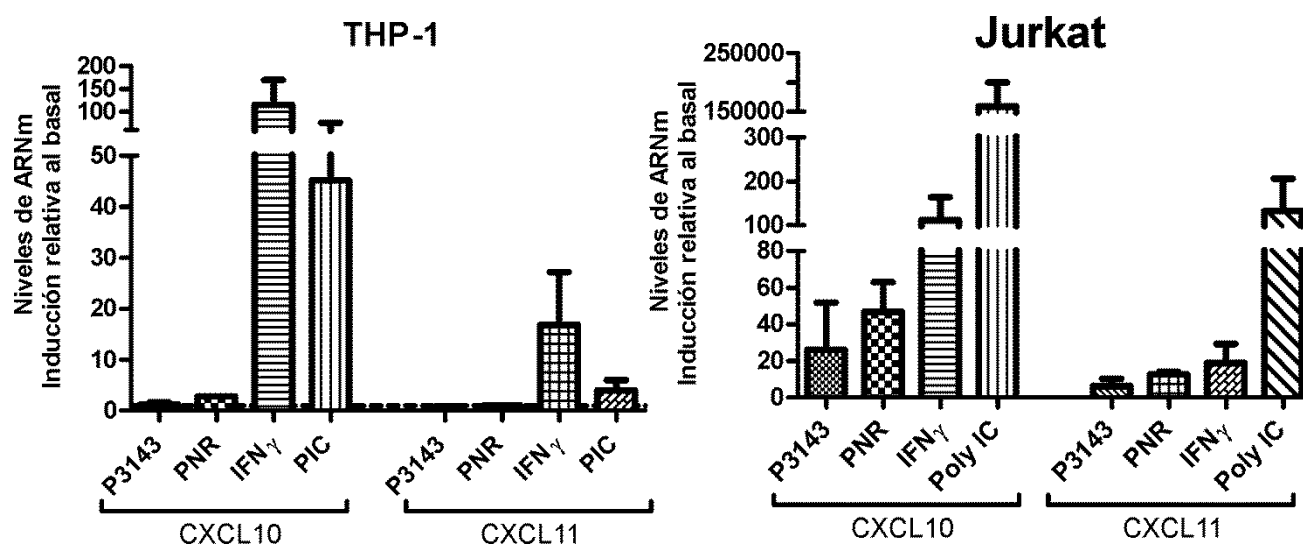


Figura 42. Análisis de expresión de los ligandos de CXCR3 en células modelos de monocitos y linfocito T. Determinación de los niveles de ARNm de CXCL10 y CXCL11 en células THP-1 y Jurkat incubadas en presencia del péptido p31-43, PNR (ambos a 100 μ g/ml), IFN γ (50 ng/ml), poly I:C (100 μ g/ml) o medio de cultivo solo durante 6 horas. Se muestra la inducción respecto al basal. Test T para muestra única; diferencias estadísticamente no significativas.

Análisis de la inducción de CXCR3 en células modelo de linfocitos T

Como hemos mostrado, la migración de los linfocitos T a la LP estaría determinada por el reclutamiento mediado por CXCL10 de células CXCR3⁺. En el caso de EC, estos linfocitos T tienen el rol más relevante en la patogenia ya que son responsables de la cronicidad de los mecanismos de daño. Por esta razón, nos interesó estudiar si el receptor CXCR3 podría ser inducido *in vitro* en células Jurkat. Con este fin se estimularon células Jurkat durante 24 horas con IL-15, poly I:C o el p31-43, y se analizó por citometría de flujo la expresión de CXCR3. Se observó que tanto IL-15 como poly I:C inducen un aumento en la expresión del receptor. En forma llamativa, la incubación con p31-43 también indujo CXCR3 (Figura 43).

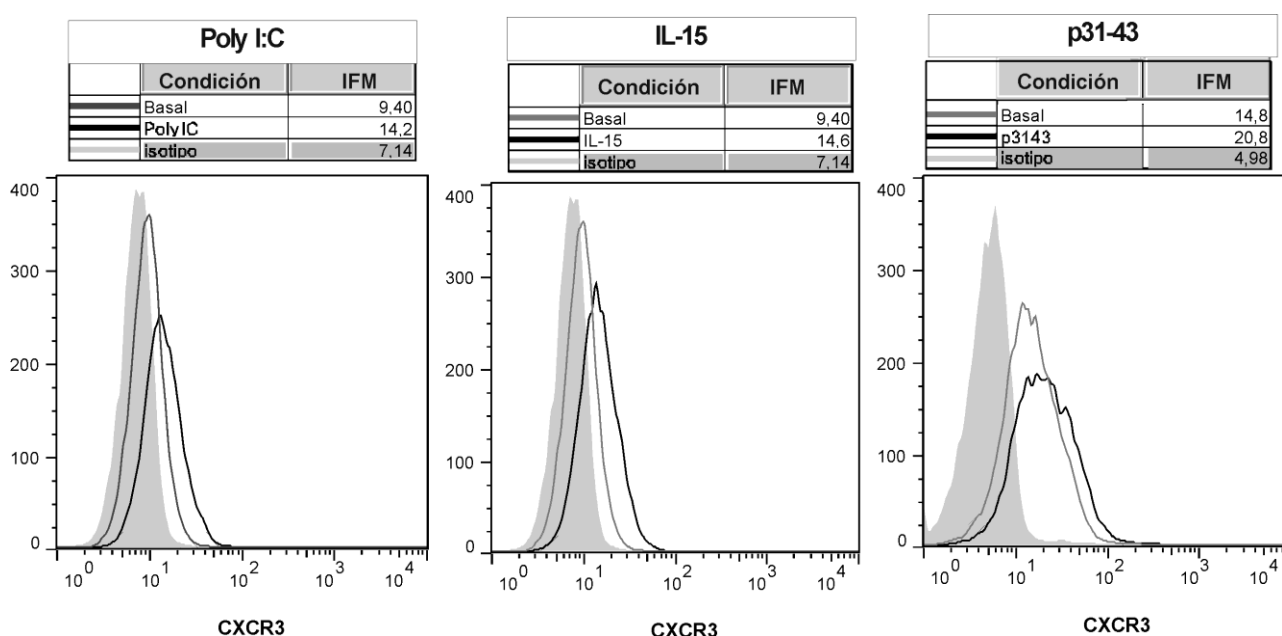


Figura 43. Análisis de la expresión de CXCR3 en células modelo de linfocitos T. Estudio por citometría de flujo de la expresión de CXCR3 en células Jurkat incubadas en presencia de poly I:C (100 µg/ml), IL-15 (50 ng/ml), p31-43 (100 µg/ml) o medio solo (basal) durante 24 horas. En las tablas se describen los valores de intensidad media de fluorescencia.

En conjunto los resultados obtenidos trabajando sobre distintas líneas celulares modelo de enterocito (Caco-2), linfocito T (Jurkat), linfocitos B (Daudi) y monocitos (THP-1) son relevantes ya que muestran, en modelos *in vitro* que los estímulos ensayados (IL-15, poly I:C y p31-43) vinculados con la patogenia de EC pueden inducir la expresión de los ligandos de CXCR3, en

especial CXCL10. Por otro lado, la expresión del receptor CXCR3 también puede ser inducida en linfocitos T por estos tres estímulos.

De esta manera, IL-15, poly I:C (como modelo de infección viral) y p31-43, podrían participar en la patogenia mediante un circuito de amplificación de los mecanismos de reclutamiento y activación local de linfocitos T en la LP y en el compartimento intraepitelial.

Discusión

Los linfocitos CD4⁺ Th1 específicos de péptidos derivados de gluten y restringidos a HLA-DQ2 o DQ8 producen IFN γ en forma abundante y juegan un papel central en la enteropatía de EC. En la mucosa de intestino delgado proximal, las poblaciones mayoritarias que se encuentran a nivel de la LP son los linfocitos CD4⁺ Th1 y las células plasmáticas. Además, se observan linfocitos T CD8⁺, los cuales ejercerían funciones citotóxicas similares a las de los linfocitos T $\gamma\delta$ y células NK, y se encuentran principalmente en el compartimento intraepitelial de la mucosa con EC activa (Abadie et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las células del sistema inmune arriban a la mucosa duodenal en EC activa no han sido descritos. Los resultados presentados en este capítulo muestran claramente la participación del eje quimiotáctico CXCR3/CXCL10 en este reclutamiento específico hacia la mucosa duodenal en respuesta a la ingesta de gluten.

CXCR3 y sus ligandos (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) están fuertemente asociados a una respuesta del perfil Th1. La expresión de CXCR3 en células T activadas es importante en la amplificación del reclutamiento a sitios periféricos mediado por IFN γ en situaciones de infección o autoinmunidad (Groom y Luster, 2011a). La expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 varía según la condición patológica estudiada, y por eso se cree que estos ligandos no cumplirían funciones biológicas redundantes (Müller et al., 2010; Groom y Luster, 2011b). CXCL10 ha sido señalada como una molécula clave en el desarrollo de autoinmunidad (Christen et al., 2003; Lee et al., 2013). Por ejemplo, en ratones transgénicos que sobre-expresan CXCL10 en páncreas se ha observado un reclutamiento rápido de células T efectoras CD4⁺ y CD8⁺ y una progresión acelerada de diabetes tipo I (Rhode et al., 2005). En este contexto, nuestro interés se centró principalmente en el ligando CXCL10, para el que encontramos concentraciones elevadas en sueros de pacientes celíacos al diagnóstico. Este hallazgo es similar a lo descrito en otras condiciones inflamatorias crónicas tales como diabetes tipo I (Antonelli et al., 2008), esclerosis múltiple (Rabquer et al., 2011) y tiroiditis autoinmune (Cakir et al., 2011). A nivel de la mucosa duodenal de pacientes observamos una expresión masiva de esta quimoquina, lo que sugiere que el intestino delgado sería la principal fuente de CXCL10 circulante durante la enfermedad activa. Estudios adicionales sobre una población más amplia podrían confirmar si los niveles de CXCL10 circulante pueden ser utilizados

como un biomarcador de la enfermedad y por lo tanto, considerar su determinación como una herramienta en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes celíacos.

Tanto la expresión de CXCL10 como la de CXCL11 se encontraron incrementadas en duodeno de pacientes celíacos al diagnóstico. Sin embargo, en los pacientes en DLG los valores fueron similares a los hallados en población control. Esto indica que en el marco de EC, la inducción de estas quimoquinas es una respuesta a mecanismos generados por péptidos derivados del gluten. Dado que los genes *CXCL10* y *CXCL11* tienen regiones promotoras similares (Groom y Luster, 2011b), estos ligandos podrían ser inducidos por las mismas vías de activación. Esto podría explicar la fuerte correlación observada entre ambos en duodeno (tanto en tejido normal como en enteropatía). Además de IFN γ , los IFNs de tipo I y en menor medida TNF α , pueden inducir la expresión de CXCL10 y CXCL11 (Groom y Luster, 2011b). Para evaluar si la expresión de estas dos quimoquinas en mucosa duodenal está gobernada preferencialmente por alguno de estos inductores en particular, determinamos los niveles de IFN γ , IFN β y TNF α en biopsias de pacientes celíacos y controles. Nuestro estudio mostró una correlación significativa de CXCL10 y CXCL11 con IFN γ en celíacos al diagnóstico, lo que sugiere que esta citoquina es la dominante en la inflamación crónica. CXCL9 mostró una expresión basal baja a nivel ARNm y proteína comparable entre la situación control y EC. En conjunto, estas observaciones sugieren que CXCL10 y CXCL11 comparten vías regulatorias en común en este tejido, mientras que CXCL9 presenta una regulación diferente.

Es importante mencionar que la afinidad de sus ligandos por CXCR3 es variada (Meiser et al., 2008; Groom y Luster, 2011b). De hecho, cada ligando interacciona de forma diferencial con los dominios del receptor. Entre ellos, CXCL11 sería el de mayor afinidad y potencia en cuanto a la activación de CXCR3 y también su internalización (Van Raemdonck et al., 2014). Además, mientras que CXCL10 se une exclusivamente a CXCR3, CXCL11 se une también a CXCR7, un receptor que no transmitiría señal dado que no está acoplado a proteína G (Singh et al., 2013). Esto es indicio de que ambas quimoquinas pueden cumplir funciones diferentes. Futuros estudios podrían ampliar la información para dilucidar estas diferencias funcionales, en particular en la mucosa de intestino delgado.

La expresión de CXCL10, y también de CXCL11, ha sido reportada en diferentes tipos celulares dependiendo del tejido en estudio, tales como linfocitos T CD4⁺, CD, células NKT, macrófagos y

células epiteliales (Lee et al., 2009; Liu et al., 2011; Xu et al., 2012). El presente estudio permitió determinar las fuentes celulares responsables de la expresión de los ligandos de CXCR3 en duodeno. En el caso de CXCL9 la expresión resultó escasa y en muy bajo número de células, por lo que no se identificaron sus fuentes. Por el contrario, tanto CXCL10 como CXCL11 presentaron una expresión abundante en caso de EC activa, encontrándose en distintas células y en la matriz extracelular. El estudio para los marcadores CD3 y HAM56 (linfocitos T y macrófagos, respectivamente) no ha dado evidencias de que estas células sean productoras de CXCL10 ni CXCL11. En cambio, se logró identificar claramente a las células plasmáticas CD138⁺ como fuente de CXCL10 y de CXCL11 en LP, tanto de controles como de celíacos. En particular, en la mucosa con enteropatía las células plasmáticas constituyen la población mayoritaria en la LP y por lo tanto, consideramos que estas células serían la principal fuente de CXCL10 y de CXCL11 en este compartimento de la mucosa duodenal. A su vez hemos mostrado que las células CD138⁺ expresan también CXCR3, lo que nos permite inferir que este eje quimiotáctico cumple un importante rol en el reclutamiento de estas células hacia la LP, y de esta manera en la amplificación del circuito de producción de las quimoquinas.

El recuento de células CXCR3⁺ en LP mostró un número incrementado en mucosa con EC activa. Nuestros resultados demuestran además que, en duodeno de pacientes en DLG, el número de células CXCR3⁺ regresa a los valores encontrados en tejido sano. Esto sugiere que el mecanismo de reclutamiento y expansión del número de células CXCR3⁺ es un evento específico en respuesta a la ingesta de gluten. Como mencionamos anteriormente, por citometría de flujo evidenciamos que estas células CXCR3⁺ de LP incrementadas en EC corresponden principalmente a células CD138⁺, pero también a linfocitos CD3⁺CD4⁺, las dos poblaciones más importantes que infiltran la LP de pacientes. Estudios previos habían reportado un incremento en los niveles de CXCR3 utilizando PCR cuantitativa (Lammers et al., 2008). Nuestros resultados difieren con estas observaciones, dado que no hemos observado diferencias entre pacientes con EC y controles en los niveles de ARNm de CXCR3 (no mostrado). Esto probablemente se deba a diferencias en los *primers* utilizados en ambos trabajos. Al momento han sido reportadas tres variantes de CXCR3 ARNm. Lammers y colaboradores probablemente detectaron la variante más abundante y a la vez mejor descrita CXCR3-A (Lasagni et al., 2003; Ehlert et al., 2004), mientras que nuestras determinaciones abarcaron indistintamente las tres formas, lo que pudo haber generado un efecto dilutorio en el resultado final de PCR cuantitativa. Estas tres variantes de CXCR3 son detectables

en linfocitos de sangre periférica (Lasagni et al., 2003; Korniejewska et al., 2011), pero poco se sabe de su expresión en intestino. La variante CXCR3-B, la cual no impartiría funciones quimiotácticas, no ha sido detectada en intestino delgado (Lasagni et al., 2003; Van Raemdonck et al., 2014) y la variante más corta CXCR3-alt no ha sido estudiada al momento en este tejido. Para comprender las diferencias funcionales de estas variantes en este tejido es necesario ampliar los estudios acerca del patrón de expresión de las distintas proteínas; y así comenzar a dilucidar su rol en intestino delgado en general y en EC en particular.

En el epitelio duodenal normal se observaron enterocitos positivos para CXCL11 pero no para CXCL10. En cambio en EC activa, los enterocitos producen activamente CXCL10 (además de CXCL11). Estas observaciones son relevantes ya que muestran que ambas quimoquinas tienen diferencias en su control de expresión. En especial, la expresión CXCL10 en este tipo celular parece corresponderse más directamente con la respuesta a la ingesta de gluten en pacientes celíacos. Estos hallazgos coinciden con descripciones de otros autores que observaron la producción de CXCL10 en epitelio de colon, en especial en condiciones patológicas como enfermedad inflamatoria intestinal (Dwinell et al., 2001; Shibahara et al., 2001; Ostvik et al., 2013). En conjunto estas descripciones resaltan la importancia del enterocito como activo productor de CXCL10 en la inflamación. En este trabajo también evidenciamos el incremento en células CD3⁺CD103⁺ en el compartimento intraepitelial, en parte a expensas de un incremento neto de células CD3⁺CD103⁺CXCR3⁺ (probablemente en su mayoría LIEs TCR αβ CD8⁺) y en parte debido al aumento de otras poblaciones CD3⁺CD103⁺CXCR3⁻. En este sentido, hipotetizamos que estas últimas pueden tratarse de LIEs TCR γδ, los cuales están incrementados en EC y de los que poco se sabe en cuanto a su patrón migratorio. De hecho, en EC se ha observado aumentada la subpoblación Vδ1 (Dunne et al., 2013), los cuales en ciertas condiciones han sido más fuertemente ligados a una migración dependiente de CXCR4 por sobre CXCR3 (Poggi et al., 2007). Dado el bajo número de las poblaciones individuales de LIEs, no fue posible caracterizar la expresión de CXCR3 en cada población individual y determinar así la contribución de cada una a las poblaciones CXCR3 positiva o negativa. En conclusión, el mecanismo de reclutamiento mediado por CXCL10 (producida por los enterocitos) sobre linfocitos T CXCR3⁺ podría explicar, al menos parcialmente, el incremento de LIEs, uno de los hallazgos histológicos más característicos en EC.

Los mecanismos que ocurren en las fases tempranas de la enfermedad no han sido caracterizados completamente. Esta etapa ha despertado nuestro interés ya que consideramos que diferentes elementos de la inmunidad innata podría tener un rol crítico en determinar el curso de inicio de la enteropatía. Las infecciones virales han sido sugeridas como inductoras de una cascada inflamatoria a nivel de la mucosa duodenal que puede confluir en la enteropatía celíaca en individuos genéticamente susceptibles (Sollid y Jabri, 2013). Por otro lado, la citoquina IL-15 es una conocida protagonista en eventos tempranos de daño, como por ejemplo potenciando la citotoxicidad de los LIEs (Meresse et al., 2004), bloqueando las vías de señalización de TGF β e inhibiendo la función de los linfocitos T reguladores (Benahmed et al., 2007). Por último, el p31-43 es un péptido derivado de gliadinas para el cual se han descrito diferentes efectos innatos. Por ejemplo, actuaría como inductor de IL-15 y también de ciclooxigenasa (COX-2) en biopsias de pacientes con EC, y tendría efectos pro-apoptóticos en enterocitos (Maiuri et al., 2003).

Nuestros estudios de estimulación de biopsias duodenales mostraron que poly I:C, utilizado como mimético de ARN de doble cadena y modelo de la respuesta innata en una infección viral, es capaz de inducir la expresión de CXCL10 y también CXCL11 en mucosa duodenal normal. IL-15 indujo también CXCL10 significativamente en estas muestras. Esto nos indica que tanto poly I:C como IL-15 activan vías existentes en la mucosa capaces de inducir CXCL10, y CXCL11 en el caso de poly I:C, en corto tiempo y de manera eficaz. Estos estímulos no provocaron cambios de expresión en la mucosa con enteropatía severa, donde probablemente todas estas vías están ya sobre-activadas.

El p31-43 llamativamente no indujo cambios de expresión para ninguno de los ligandos de CXCR3 en la mucosa duodenal control, pero si mostró disminuir significativamente la expresión de CXCL10 en biopsias de pacientes con EC activa, tendencia que también siguió CXCL11. Al presente no tenemos información sobre las vías implicadas en estos efectos inhibitorios.

Por último, nuestros estudios empleando células Caco-2 sugieren que el enterocito es capaz de responder en tiempos cortos a la estimulación con poly I:C produciendo CXCL10. También los otros tipos celulares modelados con Daudi (linfocito B), THP-1 (monocito) y Jurkat (linfocito T), responden induciendo CXCL10 ante este estímulo. Esto y lo observado en piezas de biopsia duodenal sugiere que una infección viral intestinal podría inducir CXCL10 disparando el circuito de reclutamiento celular en la mucosa e iniciar así una respuesta inflamatoria que, en un contexto genético adecuado, derive en el establecimiento de la patología. El p31-43 también mostró inducir

la expresión de CXCL10 en células Caco-2, lo que sugiere que componentes no inmunogénicos del gluten podrían activar directamente este eje quimiotáctico en etapas tempranas de la enfermedad. En línea con esta observación hay que destacar que también hemos observado inducción del receptor CXCR3 en la línea Jurkat ante el p31-43 y también ante IL-15 o poly I:C. En este sentido también debemos considerar que la señalización vía CXCR3 produce eventos de activación celular, que si bien están menos caracterizados que la migración, podrían ser relevantes en el curso de la enteropatía. Estos hallazgos en su conjunto permiten inferir que los tres estímulos de la inmunidad innata utilizados (poly I:C, IL-15 y p31-43) pueden contribuir a la activación del eje CXCR3/CXCL10.

Estos resultados demuestran la expresión de CXCR3 y sus ligandos en mucosa duodenal y sugieren un rol activo en la patogénesis de EC para el eje CXCR3/CXCL10. Los niveles aumentados de CXCL10 en suero pueden constituir la base del empleo de un nuevo biomarcador para la detección de EC activa. La inducción de CXCL10 podría ocurrir en dos etapas de la enfermedad: en estadios tempranos, disparada por estímulos innatos; y en la fase crónica, sostenida por IFN γ . Este eje quimiotáctico ya es blanco de estudios clínicos, en particular mediante el uso de anticuerpos bloqueantes de CXCL10, en patologías como artritis reumatoidea y enfermedad inflamatoria intestinal (Van Raemdonck et al., 2014). Las evidencias presentadas en este capítulo y los resultados alentadores de dichos estudios sientan antecedentes para considerar su implementación terapéutica en el marco de la enfermedad celíaca.

Conclusiones

- * Los niveles séricos de CXCL10 se encuentran elevados en pacientes con EC activa y disminuyen luego del tratamiento. CXCL10 podría ser considerado como un biomarcador, tanto en diagnóstico como en el seguimiento de la EC.
- * La mucosa duodenal de pacientes con EC sobre-expresa CXCL10, principalmente en respuesta a la acción de IFN γ . CXCL11 presenta un patrón similar de expresión, mientras que CXCL9 no presenta diferencias en la enteropatía respecto a una situación control.
- * La principal fuente celular de CXCL10 en la mucosa duodenal son las células plasmáticas. En la enteropatía celíaca, el enterocito pasa a cumplir un rol importante como productor de

esta quimocina en el compartimento intraepitelial. Enterocitos y células plasmáticas producen también CXCL11, tanto en individuos control como en pacientes con EC activa.

- * El número de células CXCR3⁺ en LP se encuentra incrementado en la mucosa duodenal con EC activa, principalmente a expensas de células plasmáticas y de linfocitos T CD4⁺ ; y en parte también de células CD3⁺CD4⁻. Este incremento desaparece con la adherencia a la DLG. Dentro del compartimento intraepitelial, también se observa mayor número de células CD3⁺CD103⁺CXCR3⁺ durante la enteropatía.
- * Poly I:C induce la expresión de CXCL10 (y de CXCL11) en la mucosa duodenal de individuos control. Las células Caco-2, Jurkat, Daudi y THP-1 responden ante este estímulo de manera similar, lo cual sugiere que tanto enterocitos como linfocitos T y B, y macrófagos podrían participar en dicha respuesta.
- * El p31-43 no mostró efectos claros sobre la mucosa duodenal normal pero sí mostró inhibir la expresión de ARNm de CXCL10 en casos de enteropatía celíaca en tiempos cortos de incubación. A mayor tiempo, las células Caco-2 en presencia de este péptido aumentan la expresión de CXCL10 a nivel de proteína.
- * IL-15 provoca aumento en la expresión de ARNm de CXCL10 en mucosa duodenal normal, no así de las otras dos quimocinas. Nuestros resultados reflejan además una vinculación entre IL-15, IFN γ y CXCL10 en la mucosa duodenal diferencialmente regulada en EC respecto a controles.
- * Ante estas evidencias, proponemos el siguiente modelo para explicar el inicio y sostenimiento de mecanismos de reclutamiento celular en EC mediado por CXCL10 (**Figura 44**).

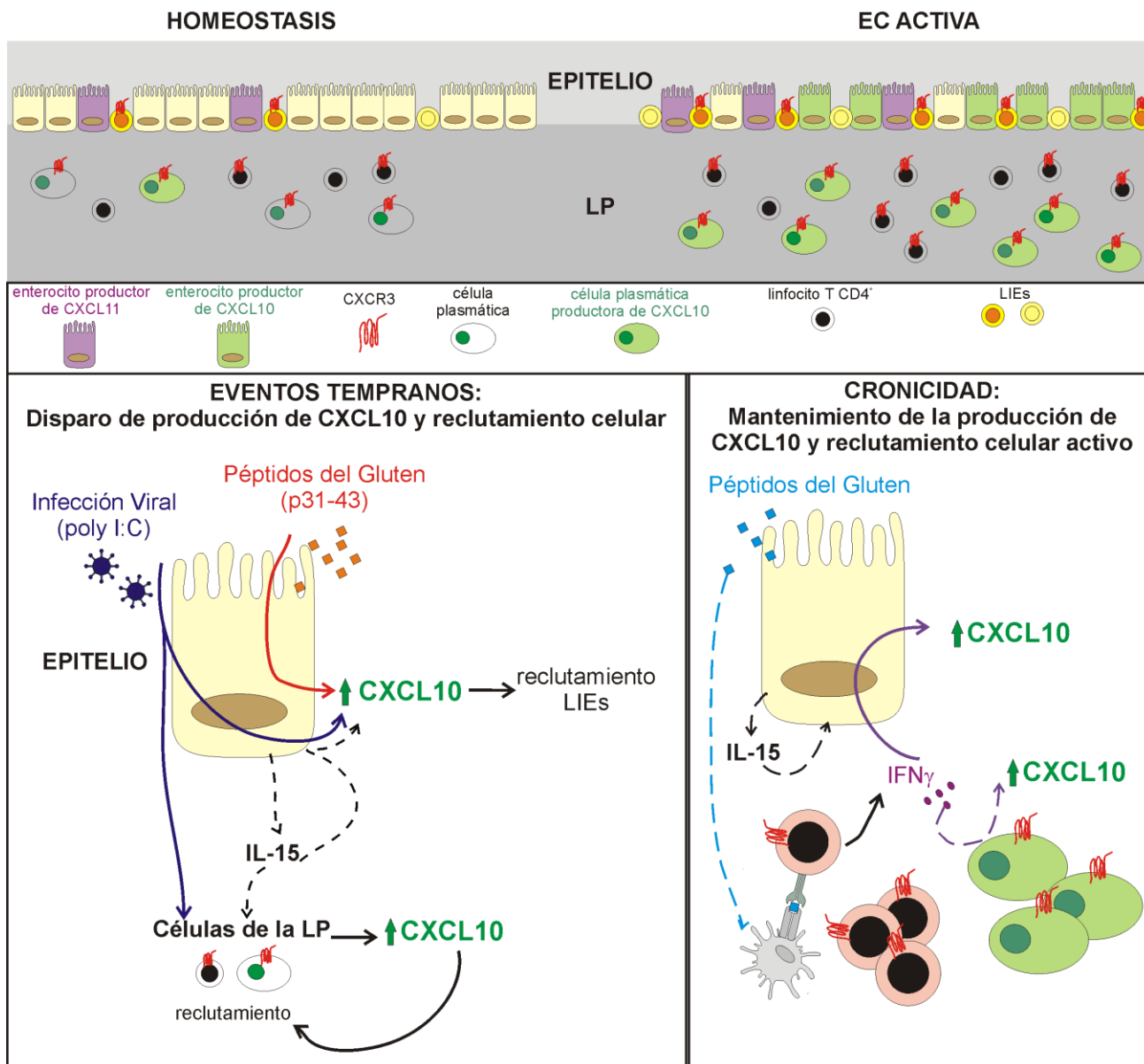


Figura 44. Mecanismo modelo de reclutamiento celular en EC mediado por el eje CXCR3. Enfatizamos la importancia de CXCL10 entre los ligandos de CXCR3. CXCL11 se esquematiza solamente en epitelio, aunque es también producido por células plasmáticas en la LP en homeostasis y en EC activa.

Capítulo 3

Estudio de los mecanismos de estrés y de muerte celular en la mucosa duodenal durante la enteropatía celíaca

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en el artículo: “*Broad MICA/B expression in the small bowel mucosa: a link between cellular stress and celiac disease*”. Allegretti YL, Bondar C, Guzmán L, Cueto Rúa E, Chopita N, Fuertes M, Zwirner N and Chirido F. PLoS ONE (2013) 8(9):e73658.

Introducción

La enteropatía celíaca está caracterizada por un daño estructural a nivel de la mucosa del intestino delgado principalmente en la región proximal, que implica como características más salientes la atrofia vellositaria, hiperplasia de criptas, marcado aumento de LIEs y un infiltrado linfocitario en la LP. Si bien este daño ha sido atribuido a linfocitos T CD4⁺ específicos activados en LP, y también a la actividad citotóxica de LIEs sobre enterocitos, los mecanismos moleculares que derivan en la enteropatía aún no han sido descritos completamente.

Al momento son pocos los trabajos que han estudiado los mecanismos de daño existentes en la mucosa intestinal durante la EC. Es claro que el número de LIEs (linfocitos T CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$, y células NK) está aumentado en EC activa y serían responsables del aumento de IFN γ , granzimas y perforinas en el compartimiento epitelial, con la consecuente apoptosis de enterocitos. La persistencia de un microentorno con IL-15 incrementada, podría activar linfocitos T y células NK intraepiteliales y, a través de la interacción de receptores de superficie como NKG2D o CD94/NKG2C con sus ligandos expresados en el enterocito (MIC-A o HLA-E, respectivamente), ejercer acciones citotóxicas sobre la célula epitelial (Meresse et al., 2012). El daño directo del enterocito por parte de LIEs podría estar mediado además de granzimas y perforinas, por el sistema Fas/FasL (Ciccocioppo et al., 2000). Esto podría estar generado por un incremento en la expresión de FasL en linfocitos T, como se observó en pacientes celíacos al diagnóstico (Di Sabatino et al., 2001), y también por un aumento en la expresión de Fas en el epitelio (Maiuri et al., 2001). Además se ha descrito que péptidos derivados de gliadinas pueden inducir la expresión de Fas en enterocitos en biopsias duodenales de pacientes celíacos (Mazzarella et al., 2008). Otros

trabajos apoyan la existencia de mecanismos autócrinos en los enterocitos que liberarían FasL en presencia de péptidos de gliadinas (Giovannini et al., 2003).

Si bien siempre se mencionan mecanismos apoptóticos para referirse a la muerte del enterocito, la mayoría de estos trabajos datan de los años 2000 a 2005, cuando aún no habían sido descritas otras rutas de muerte regulada alternativas, y no han sido profundizados posteriormente. Además, si bien se abocaron al estudio de moléculas iniciadoras de procesos de muerte (como granzimas o el sistema Fas/FasL), poco se sabe de las rutas moleculares implicadas en las etapas medias o finales del daño o muerte celular, dado que la técnica de TUNEL, utilizada en la mayoría de dichos trabajos, si bien indica muerte celular no aporta información acerca de cuál fue el mecanismo que originó dicho proceso. En este marco, recientemente ha sido publicado un estudio por inmunohistoquímica de marcadores propios de apoptosis como caspasa-3, los que se encontraron sobre-expresados en mucosa intestinal en EC activa (Shalimar et al., 2013).

Este campo ha evolucionado muy rápidamente en estos últimos años, y su mayor conocimiento tiene enormes implicancias en la comprensión del daño en la mucosa intestinal en EC activa. Por lo tanto, y con el fin de ilustrar el complejo entorno de los marcadores aquí estudiados, describiremos algunos aspectos esenciales de mecanismos de muerte celular y de estrés de retículo endoplasmático.

Mecanismos de Muerte Celular

Las características de una célula que muere por apoptosis, implican pérdida del volumen celular, condensación y marginación de la cromatina, y en etapas finales, la formación y liberación de vesículas de membrana intacta conteniendo restos de organelas llamadas cuerpos apoptóticos. La fragmentación del ADN en estos casos es un proceso mediado por endonucleasas específicas que generan fragmentos de tamaños regulares y múltiplos de 200 pares de bases. Estas características morfológicas difieren de una muerte por necrosis donde, en respuesta a condiciones de hipoxia, isquemia, inflamación, etc., la célula presenta hinchamiento, pérdida de la integridad de la membrana con la consecuente pérdida de su contenido citoplasmático y nuclear, y degradación aleatoria del ADN por enzimas lisosomales.

La apoptosis puede llevarse a cabo por dos vías principales. La vía extrínseca es disparada por ligandos de la familia de TNF como TNF α , FasL y TRAIL, que interaccionan con sus receptores en

la membrana de la célula blanco (TNFR1, Fas y TRAILR1/2, respectivamente). Esta interacción provoca la trimerización del receptor y el reclutamiento de ciertas moléculas: TRAILR1/2 o Fas reclutan a FADD y procaspasa-8 mientras que TNFR1 incluye además a TRADD y TRAF2. El complejo resultante lleva al clivaje de la procaspasa iniciadora hacia su forma activa caspasa-8. En algunos casos, como en los linfocitos, la señal percibida por los receptores es suficiente para que la caspasa-8 generada por esta vía clive las procaspasas efectoras 3 o 7. Luego sus formas activas, caspasa-3 o 7, actúan sobre sus sustratos, acción que termina en la muerte celular. En otros casos, la vía extrínseca está comunicada con la vía mitocondrial a través del clivaje de la molécula Bid por parte de caspasa-8 (Long y Ryan, 2012).

La vía intrínseca o mitocondrial es sumamente compleja y puede ser disparada por estímulos intracelulares como daño del ADN o estrés oxidativo. Estos estímulos inducen un proceso de permeabilización de la membrana externa mitocondrial desatando así la maquinaria apoptótica. El citocromo c es liberado de la mitocondria y promueve la formación del apoptosoma, complejo que lo contiene junto con Apaf-1 y caspasa-9. Caspasa-9, una vez activada en el apoptosoma, cliva a las caspasas efectoras 3 o 7, comunes a las dos vías. Junto con la liberación de citocromo c de la mitocondria pueden liberarse factores como Smac/DIABLO u OMI que atenúan la actividad de IAPs (proteínas inhibidoras de caspasas) promoviendo así la actividad de las caspasas. Por otro lado, la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) y de Endonucleasa G, juegan un rol muy importante. AIF es capaz de translocarse al núcleo ante estímulos apoptogénicos y generar fragmentación del ADN. De manera similar actúa la endonucleasa G. Diversas evidencias experimentales sostienen que AIF y Endonucleasa G son capaces de liberarse de la mitocondria en ausencia de actividad de caspasas y ejercer apoptosis de forma independiente de las mismas (Candé et al., 2004; Circo y Aw, 2010).

Hay que destacar que el proceso que lleva a la permeabilización de la membrana mitocondrial es muy complejo y altamente regulado. Básicamente comprende el balance entre proteínas de la familia de Bcl-2 con funciones pro y anti-apoptóticas. Esta familia abarca proteínas pro-apoptóticas como Bak y Bax; y proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL que se unen a las anteriores inhibiéndolas. Un tercer grupo de esta familia incluye a proteínas llamadas "BH3 only" como tBid, Bad, Bim, Noxa y Puma quienes promueven la permeabilización de la membrana mitocondrial.

Como hemos mencionado, la vía extrínseca se comunica en algunos casos con la intrínseca a través del clivaje de Bid a tBid por parte de caspasa-8 (Long y Ryan, 2012).

Finalmente, la apoptosis puede también ser disparada por granzimas. Algunas granzimas (serina proteasas presentes en los gránulos de linfocitos T citotóxicos y células NK) son capaces de clivar caspasas en la célula blanco y de esa manera, provocar su muerte por apoptosis. La mejor caracterizada es la Granzima B (GrzB), la cual puede clivar directamente caspasa-3, 7, 8 o 10, pero además puede interferir a nivel de la mitocondria en la célula blanco. Por el contrario, GrzA ejercería su acción a nivel de la mitocondria aumentando la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el daño celular que imparte podría ser independiente de caspasas. A su vez, GrzB y también GrzA pueden clivar directamente sustratos compartidos con caspasa-3, como PARP-1 (Zhu et al., 2009; Ewen et al., 2012). Son muchos los sustratos de las caspasas efectoras, uno de los más utilizados técnicamente para poner en evidencia la presencia de procesos apoptóticos ha sido PARP1. PARP1 es una enzima nuclear involucrada en procesos de reparación del ADN, que al ser clivada por caspasa-3 o por caspasa-7, pierde su función (Chaitanya et al., 2010). En la **Figura 45** se esquematizan de manera resumida las vías apoptóticas aquí discutidas.

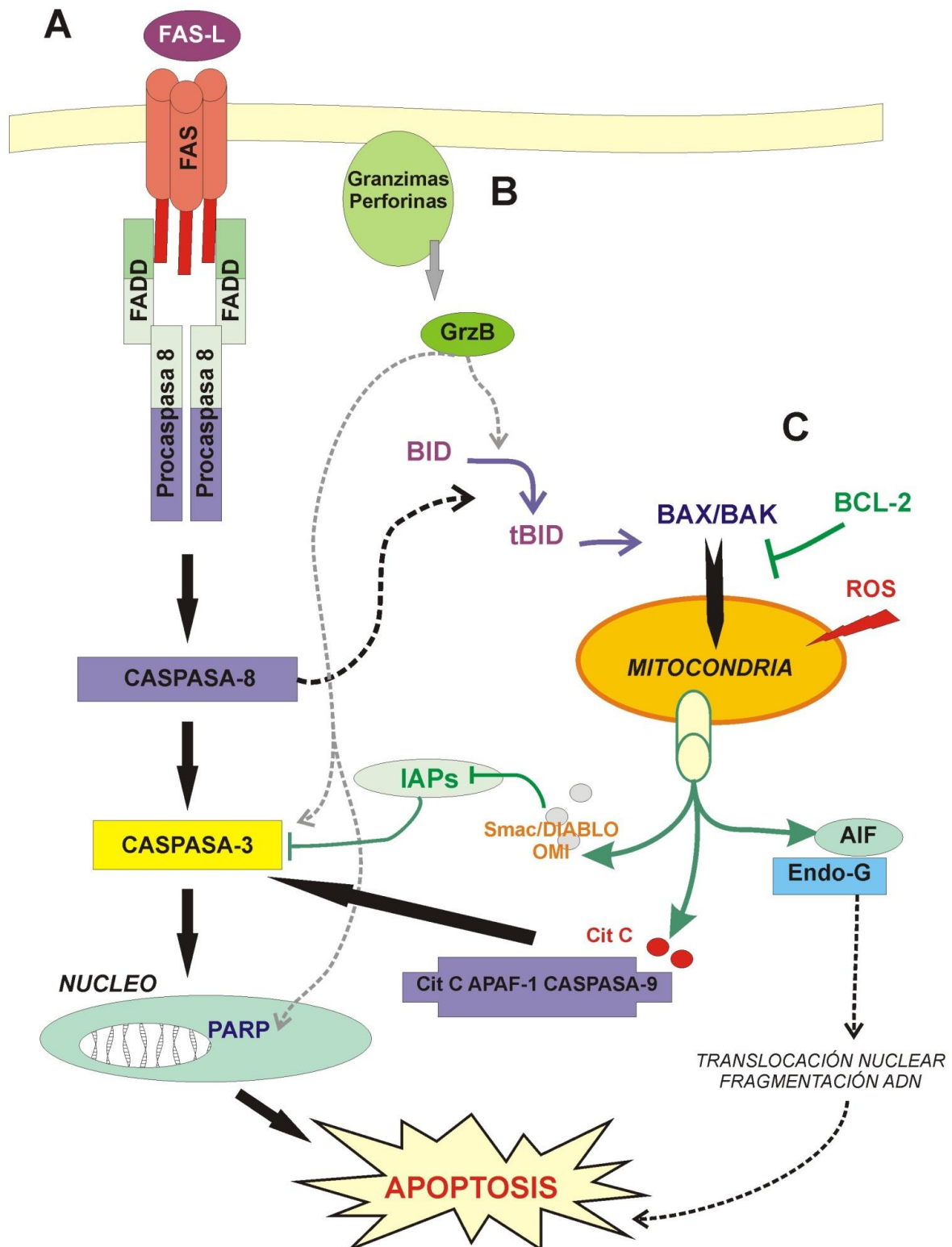


Figura 45. Vías moleculares implicadas en apoptosis. A) Vía extrínseca: activada por ligandos de la superfamilia de TNF como FasL que lleva a la activación de la caspasa iniciadora caspasa-8, y finalmente la efectora, Caspasa-3. B) Las granzimas liberadas por linfocitos T citotóxicos o células NK pueden disparar apoptosis en la célula blanco clivando y activando caspasa-3 directamente o también por la vía mitocondrial clivando BID. C) Vía intrínseca: la permeabilización de la membrana mitocondrial puede estar disparada por estímulos como ROS, está regulada por proteínas pro y anti apoptóticas (BAX/BAK, Bcl-2; respectivamente). Su activación provoca liberación del citocromo c, formación del apoptosoma (cit c, APAF-1, caspasa-9) y activación de caspasa-3. También se liberan proteínas inhibitorias de IAPs (Smac/DIABLO, OMI). Además la liberación de AIF y Endonucleasa G desde la mitocondria puede generar apoptosis independiente de caspasas.

Como hemos mencionado, en los últimos años han sido descritas otras rutas de muerte celular controlada distintas a la apoptosis. Una de ellas es la necroptosis, la cual reviste de interés dado que ha sido estudiada en mucosa intestinal. En este proceso se comparten características morfológicas con células muertas por necrosis. La necroptosis implica a las vías desencadenadas por el complejo RIPK1-RIPK3 (*receptor-interacting protein kinase 1 y 3*) (Moriwaki y Chan, 2013; Giampietri et al., 2014). Tanto necroptosis como apoptosis pueden ser iniciadas por los mismos estímulos, y parte de las moléculas mediadoras de ambos procesos se ven solapadas. Luego de la unión de TNF α a TNFR1, pueden formarse diferentes complejos. Los mismos pueden derivar en señales de supervivencia (complejo I), de apoptosis (complejo IIa) o de necroptosis (complejo IIb). La formación de uno u otro tipo del complejo II, depende en gran medida de la presencia de proteínas cFLIPs (la isoforma corta de cFLIP: *cellular FLICE-inhibitory protein*), quienes impiden la activación de procaspasa-8 (Weinlich et al., 2011). En general, en condiciones de inhibición de caspasa-8, RIPK1 y RIPK3 se acumulan y predomina el complejo IIb o necrosoma. Es posible que la actividad de caspasa-8 inactive por clivaje a RIPK1 y a RIPK3 (Kaczmarek et al., 2013). Entre las dos moléculas, RIPK3 ha sido la más exclusivamente ligada a procesos necroptóticos. Uno de los sustratos más importantes de RIPK3 es MLKL (*mixed lineage kinase domain like protein*) que al ser fosforilado desencadena su acción en organelas celulares, principalmente en la mitocondria, con la consecuente formación de ROS y daño celular que culmina en la muerte de la célula (Giampietri et al., 2014). Para ilustrar la complejidad del sistema, en la **Figura 46** se esquematizan las rutas necroptóticas. Recientemente ha sido descrita la expresión incrementada de RIPK3 en íleon terminal, principalmente en células de Paneth, en pacientes con enfermedad de Crohn (Günther et al., 2011). Estas observaciones sugieren que la necroptosis podría contribuir al desarrollo de desórdenes inflamatorios en intestino.

La necroptosis puede dispararse además por ligandos de TLR3 o TLR4, y también necesita en estos casos un entorno de actividad deficiente de caspasa-8 (Günther et al., 2014). Además de su rol en necroptosis, RIPK1 y RIPK3 estarían implicados en la activación del inflamasoma NLRP3. El inflamasoma es un complejo macromolecular compuesto por caspasa-1, ASC1 (adaptadora) y el sensor NLRP3. La producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β requiere de la formación *de novo* de su precursor (pro-IL-1 β) y el clivaje del mismo hacia su forma activa que ocurre post activación del inflamasoma y vía caspasa-1 (Moriwaki y Chan, 2013). Puntualmente, la

participación de RIPK1-RIPK3 sería imprescindible en la activación de este inflammasoma ante infecciones de virus de RNA (Wang et al., 2014).

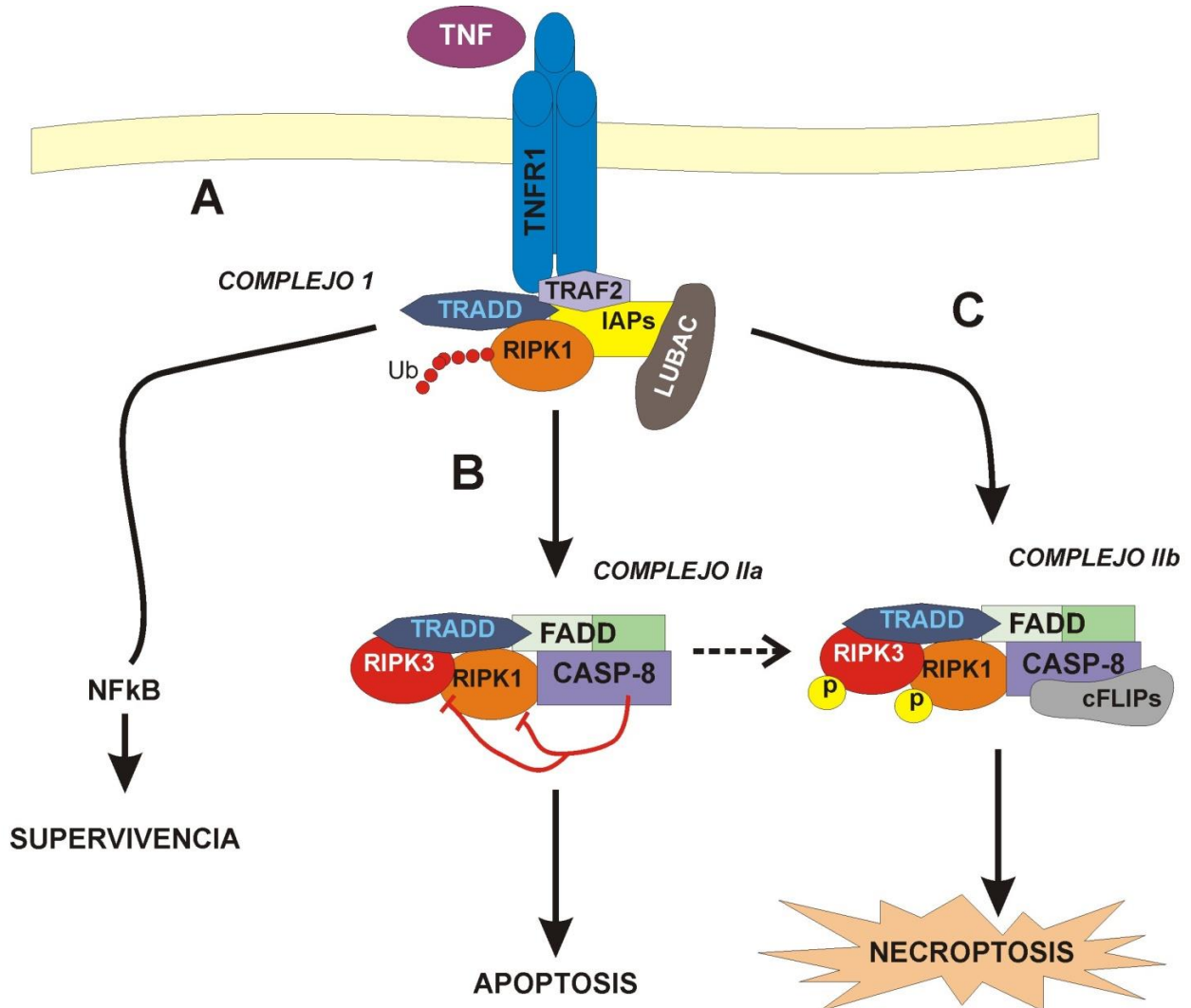


Figura 46. Vías moleculares implicadas en necroptosis. A) Cuando TNFR1 es activado se genera el complejo I asociado al receptor, con RIPK1 ubiquitinado, que desencadena señales de supervivencia vía NFkB. B) La desubiquitinación de RIPK1 convierte la señal de supervivencia en una de muerte vía la internalización del complejo y formación del complejo II. Cuando predomina caspasa-8 activa, hay inhibición de RIPK1 y RIPK3 por clivaje, se forma el complejo IIa y se dispara la apoptosis. C) El necrosoma puede formarse cuando hay sobre-activación de RIPK3, o cuando predomina cFLIPs, quien inhibe a caspasa-8 permitiendo la fosforilación de las proteínas RIPK y su activación. *Adaptado de Kaczmarek et al., 2013.*

Estrés de Retículo Endoplasmático

En el retículo endoplasmático (RE) se producen las modificaciones post-traduccionales de las proteínas que tienen como destino la membrana celular o ser secretadas. Una importante fuente de

estrés endógeno para la célula es el estrés de RE, que ocurre ante la acumulación de proteínas no plegadas o plegadas incorrectamente en el lumen del RE (Hetz, 2012). Esta situación puede darse ante numerosos factores como por ejemplo, isquemia, infecciones virales, compuestos tóxicos, cambios de pH, etc. En general, situaciones que aumenten la síntesis proteica en una tasa que supere la capacidad de las chaperonas del RE, generan estrés de RE. Para adaptarse a esta situación la célula eucariota pone en marcha un mecanismo llamado *unfolded-protein response* (UPR). Este mecanismo aumenta la transcripción de chaperonas, la degradación de proteínas mal plegadas y disminuye la traducción proteica en general, con la finalidad de restablecer la correcta función de RE. En algunos casos, la célula no lo logra y deriva en apoptosis. El mecanismo UPR es también esencial en el desarrollo y supervivencia de células altamente secretoras, como las células plasmáticas (Todd et al., 2008; Li et al., 2014).

Los ejes principales encargados de determinar el estado de estrés y disparar o no las vías de UPR implican a tres proteínas transmembrana localizadas en el RE: IRE1, PERK y ATF6. En condiciones homeostáticas, estas proteínas se hallan secuestradas en complejos inactivos con una chaperona llamada BIP (también conocida como HSPA5 o GRP78). El modelo más aceptado en la actualidad sostiene que en condiciones de estrés, la gran cantidad de proteínas mal plegadas en el lumen del RE compete y desplaza a BIP de su unión a los sensores conduciendo a su liberación y consecuente activación.

La más inmediata de las vías ante un estrés moderado sería la activación de PERK por oligomerización y transfosforilación (Hetz, 2012). PERK también fosforila e inactiva EIF2 α (*eukariotic translation-initiation factor 2 α*) disminuyendo así la tasa de síntesis proteica. Sin embargo, existen transcriptos que evaden esta inhibición como ATF4, que es inducido ante la activación de PERK y dispara la activación transcripcional de elementos efectores de la UPR. Uno de los más importantes es CHOP, un factor de transcripción que promueve la apoptosis, y que si bien en condiciones homeostáticas está expresado en muy bajos niveles, cobra relevancia en situaciones de estrés crónico. CHOP logra principalmente suprimir la expresión de Bcl-2 y aumentar la de BAX y caspasa-3 favoreciendo la apoptosis. Otro blanco de CHOP es GADD34, quien ejerce una regulación negativa del eje desfosforilando EIF2 α , restaurando así la síntesis proteica e inhibiendo a ATF4. Esto colabora indirectamente con un estado pro-apoptótico dado que contribuye a un estado de estrés oxidativo. Si bien la principal vía de activación de CHOP es PERK,

los otros dos sensores de estrés también logran inducir su expresión en menor medida (Todd et al., 2008; Tabas y Ron, 2011; Li et al., 2014).

Al liberarse BIP dimeriza IRE1 y se activa por autofosforilación. IRE1 tiene además de función quinasa, una actividad endonucleasa muy específica que le permite clivar el ARNm que codifica para XBP1 escindiéndole un intrón y permitiendo la síntesis de un factor de transcripción estable, XBP1s, que transloca al núcleo e induce la transcripción de genes involucrados en el proceso denominado “degradación asociada al retículo endoplasmático” (ERAD). Esta vía consiste en el transporte de proteínas mal plegadas del RE al citosol para su degradación en el proteosoma, proceso en el que la chaperona EDEM1 está implicada. XBP1s también modula la síntesis de lípidos requerida para la expansión del RE durante el estrés (Todd et al., 2008; Hetz, 2012). En mamíferos existen dos isoformas de IRE1: IRE1 α , que es expresada de manera ubicua, e IRE1 β que es expresada específicamente en células del epitelio intestinal, lo cual es indicador del rol especial que cumple la UPR en la homeostasis de estas células (Kaser et al., 2011; Tabas y Ron, 2011). En condiciones de estrés prolongado, IRE1 puede mediar apoptosis al interactuar con TRAF2 y JNK (*Jun N terminal Kinasa*) o inhibiendo la expresión de Bcl-2 y activando Bax, o también activar caspasa-12, (Todd et al., 2008; Schönthal, 2012). Caspasa-12 es una caspasa fundamentalmente inflamatoria cuyo rol biológico es aún poco comprendido.

El tercer brazo de la UPR consiste en la activación de ATF6. Una situación de estrés de RE hace que ATF6 se libere de BIP y sea translocado al Golgi donde es clivado. El fragmento citoplasmático ATF6f liberado se dirige al núcleo para modular la expresión de diversos genes, incluyendo componentes de ERAD como EDEM1, XBP1, CHOP y chaperonas residentes de RE como GRP94 y BIP, estas últimas son inducidas también por los otros sensores (Todd et al., 2008; Marzec et al., 2012; Sano y Reed, 2013). En la **Figura 47** se esquematizan las rutas descritas para la respuesta UPR.

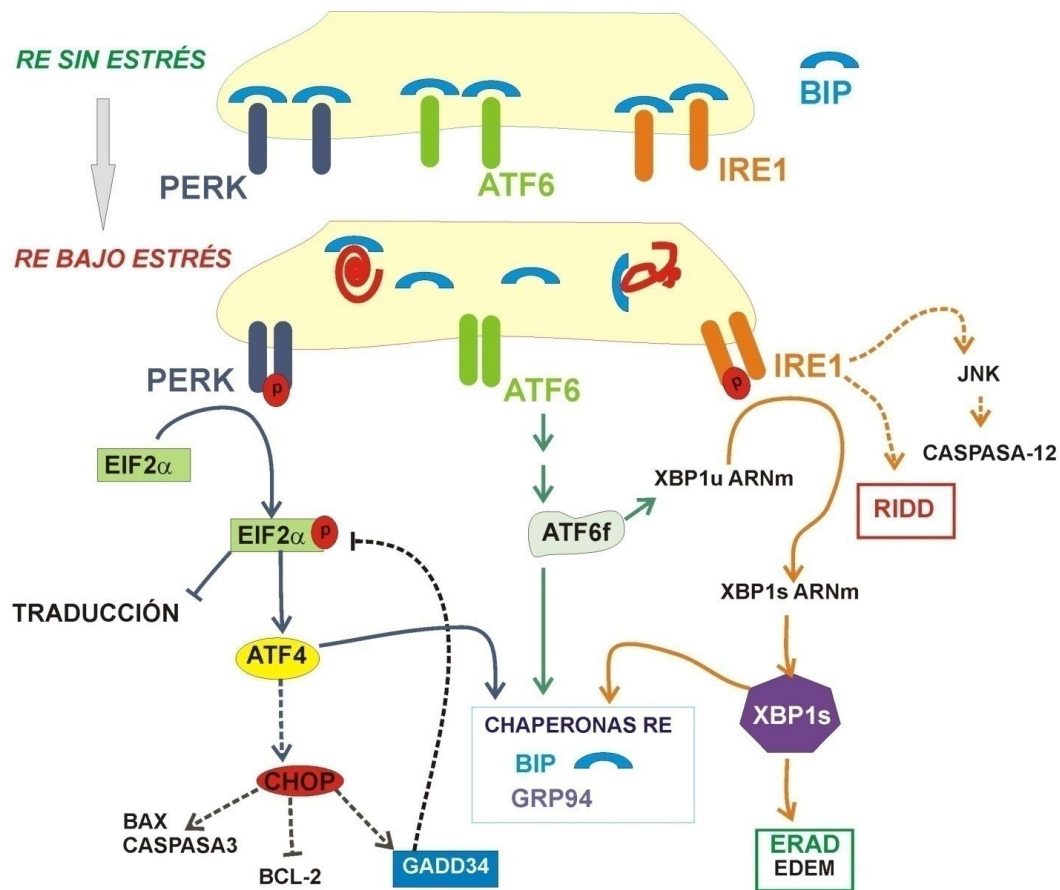


Figura 47. Estrés de retículo endoplasmático y *unfolded protein response* (UPR). Conexión con vías apoptóticas. Se esquematizan las vías de la respuesta UPR. Cuando el RE sufre estrés, BIP se separa de los tres sensores, PERK, IRE1 y ATF6, y se disparan sus vías de señalización. Las puntas de flecha significan inducción positiva, las puntas rectas señal de inhibición. Las curvas llenas representan vías propias de la UPR en niveles de estrés fisiológicos mientras que las punteadas representan vías que cobran mayor relevancia en situación de estrés crónico o patológico dado que conectan con vías apoptóticas. RIDD: *regulated IRE1-dependant decay*.

En conclusión, la respuesta UPR trata de restablecer la homeostasis en el RE pero en situaciones de estrés crónico puede derivar en la muerte de células que no logran sobreponerse a este estado, para lo cual existe una compleja regulación de estas vías con componentes de las vías apoptóticas.

En enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se ha detectado la presencia de estrés de RE en células de la mucosa intestinal. Situaciones crónicas de este tipo de estrés pueden ser tanto causa como consecuencia de un proceso inflamatorio (Hetz, 2012; Kaser y Blumberg, 2009). En el contexto de la EC, se ha reportado que péptidos derivados de gliadinas son capaces de inducir estrés de RE en células intestinales epiteliales (Caputo et al., 2012). Tanto las vías de estrés como de muerte celular han sido poco estudiadas en la mucosa intestinal con enteropatía celíaca.

Objetivos Específicos

Los mecanismos de daño que derivan en la enteropatía celíaca no son comprendidos completamente. En este contexto, nos proponemos evaluar la expresión de moléculas asociadas a estrés de retículo y a la UPR con el fin de dilucidar si existe estrés de RE en mucosa duodenal de pacientes celíacos. Además, estudiar el balance de muerte y proliferación celular en la mucosa duodenal de pacientes celíacos al diagnóstico y controles. Puntualmente, estudiaremos marcadores de muerte celular por apoptosis (Caspasa 3, PARP1, BAX/BCL2, FAS/FASL) y de necroptosis (RIPK3) como posibles mecanismos involucrados en la patogenia.

Materiales y Métodos

Pacientes y muestras

Las biopsias duodenales de pacientes adultos y pediátricos fueron obtenidas durante el procedimiento diagnóstico de rutina, como ya fue explicado en el Capítulo 2. Para los estudios de expresión génica, se procedió a coleccionar una biopsia duodenal por paciente en RNAlater (Ambion, cat AM7020) y se mantuvo a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras destinadas a evaluación por la técnica de TUNEL o para estudios por inmunofluorescencia fueron fijadas en formol e incluidas en parafina. Para la detección de caspasa-3 clivada las muestras se incluyeron inmediatamente en medio de montaje para criostato y se congelaron en nitrógeno líquido para ser conservadas luego a -80°C hasta su utilización. Las muestras destinadas a western blot se transportaron en frío y de manera inmediata al laboratorio y se lisaron en buffer de lisis con inhibidores de proteasas. Se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

Ensayos de expresión génica por PCR cuantitativa

El procedimiento fue el mismo que el descrito en el Capítulo 2. Se incluyeron en este estudio un total de 24 biopsias duodenales correspondientes a individuos no celíacos (14 pediátricos y 10 adultos), 24 de pacientes celíacos al diagnóstico (16 pediátricos y 8 adultos) y 4 pacientes en DLG (1 pediátrico y 3 adultos). En la **Tabla 13** se describen las secuencias de los *primers* utilizados. El programa utilizado fue el siguiente: 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 62°C durante un minuto, y 95°C por 15 segundos.

Tabla 13. Secuencia de primers utilizados.

GEN	Forward	Reverse
BIP	GGTACTGCTTGATGTATGTC	GTCTTTCACCTTCATAGACC
EDEM1	TCCTGACACCAATAATGAGAC	ACGACATTGCCTAGTAATCC
CHOP	GACTTAAGTCTAAGGCACTG	GATACACTTCCTTCTTGAACAC
GADD34	CCATCTATGTACCTGGAGAG	AAATGGACAGTGACCTTCTC
GRP94	ATCAAACCAATATGGCAGAG	CATATCATGGAAGTCGTCTG
FASLG	CAGAACTCCGAGAGTCTACC	TAGGTGTCTTCCCATCCAG
FAS	AAAGTGTTAATGCCCAAGTG	ATTCCACTTCTAAGCCATGTC
BCL2	CGATCTGGAATCCTCCTAATTT	CTACTTCCTCTGTGATGTTGTATT
BAX	CATCTGGAAGAAGATGGGCT	CCGAAGGAGGTTTATTACCC
XBP1 U	TGCTGAGTCCGCAGCACTCA	GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG
XBP1 S	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG
β-actina	ATGGGTCAGAAGTCTATGTG	CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGTC

Técnica de TUNEL

A partir de las biopsias incluidas en parafina se realizaron cortes de 5 μ m de espesor, se desparafinaron y rehidrataron. Se utilizó el kit Dead End Fluorometric TUNEL system (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma, cat D8417) a la concentración de 1 μ g/ml por 3 minutos. Los preparados fueron montados utilizando un medio de montaje para fluorescencia (DakoCytomation, cat S3023) y visualizados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti (fuente de luz: X-Cites Series 120 Q). Las imágenes se obtuvieron con una cámara Nikon (Nikon Digital Sight DS Ri1), usando el software Nis-Elements. El recuento de células positivas se realizó utilizando el software Image J, calibrado de manera tal de poder medir el área de zonas de LP seleccionadas. Las áreas de LP se seleccionaron a lo largo de toda la sección histológica y sobre las mismas se realizó el recuento. Se expresó el resultado como número de células TUNEL⁺ por mm² de LP.

El recuento de enterocitos TUNEL⁺ en criptas se realizó utilizando el software Imaje J, aplicando un filtro Watershed y seleccionando las criptas para recuento delimitado de núcleos. Las células positivas se contaron manualmente.

Inmunofluorescencia

Para la marcación de Ki67, BIP y RIPK3 se procedió de manera análoga a la explicada en el capítulo 2. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Ki67 (NovusBiologicals, cat NB600-1252) diluido 1/50 e incubado toda la noche a 4°C; un anticuerpo policlonal anti-RIPK3 (abcam, cat ab56164) diluido 1/10 e incubado toda la noche a 4°C, y una dilución 1/50 de un anticuerpo monoclonal anti-BIP (CellSignaling, cat 3177) incubado durante una hora. En todos los casos, se utilizó como anticuerpo secundario una dilución 1/200 de un anticuerpo obtenido en cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa-488 (Invitrogen, cat A11008), incubado durante 30 minutos. Para la doble marcación de BIP con CD138 se empleó el anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-CD138 (DAKO, cat M7228) a la dilución 1/25.

Para las imágenes de microscopía confocal los núcleos fueron coloreados con yoduro de propidio a la concentración de 1 µg/ml durante 15 minutos (Sigma, cat P4170). Los preparados fueron montados utilizando un medio de montaje especial para fluorescencia (DakoCytomation, cat S3023) y visualizados en un microscopio confocal TCS SP5 de Leica. Se obtuvieron las imágenes con el software Leica LAS AF. Para el recuento de células Ki67 positivas por unidad de área de LP y por cripta se procedió de manera análoga a la descrita para la técnica de TUNEL. Para esto se colorearon los núcleos con DAPI y se visualizaron los preparados en un microscopio Nikon.

Para la marcación de caspasa 3 clivada se utilizaron muestras conservadas en medio de montaje para criostato *Cryoplast* (Biopack). Se realizaron cortes de 15 µm en criótomo. Los cortes fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS y se les realizó un lavado con PBS-Tween 0,1% de 15 minutos. El bloqueo se realizó con suero equino al 5% en PBS, 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 clivada conjugado a FITC (Cell Signaling, cat 9669) en una dilución 1/10 durante una hora. Se realizaron lavados con PBS-Tween, se marcaron los núcleos con yoduro de propidio, se montaron los preparados y se visualizaron en un microscopio confocal tal cual se describió anteriormente.

Aislamiento de células y citometría de flujo

Se procesaron muestras de biopsias duodenales correspondientes a un paciente celíaco y tres individuos control de la población pediátrica. Para el aislamiento de células del compartimento epitelial se procedió de manera análoga a la descrita en el capítulo 2, así como también para la permeabilización de las células, marcación y la correspondiente adquisición y procesamiento de

datos. El anticuerpo utilizado para caspasa-3 clivada fue el mismo que fue empleado para la técnica de inmunofluorescencia.

Análisis por western blot de marcadores de vías de estrés y muerte celular.

Las muestras (biopsias duodenales, dos piezas obtenidas de cada paciente) se conservaron a -80°C en un tubo seco hasta su procesamiento. Se obtuvo el lisado proteico de las mismas a partir de la ruptura mecánica en el buffer de lisis: 10mM HEPES pH=7,9; 1mM EDTA, 60 mM KCl, 0,2% Nonidet P40, 1µM DTT, 1µM PMSF, 0,1 µg/ml aprotinina (Sigma, St Louis, MO, EEUU), 0,1 µg/ml leupeptina (Sigma St Louis, MO, EEUU), 1µM vanadato de sodio y 5µM NaF. La cuantificación de proteínas en los extractos se realizó mediante el método de ácido bicinconínico (BCA, Pierce Laboratories, Rockford, IL).

La separación de proteínas se realizó a partir de 30 µg por muestra que fueron sembrados en un gel de poliacrilamida preparado con una concentración de 10% (determinación de PARP1) o de 15% (determinación de caspasa-8, caspasa-3, caspasa-1, BIP o RIP3). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubas Tetra Cell (BioRad, Hercules, CA, EEUU), con una fuente PowerPac Basic (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Se empleó una corriente constante de 20 mA para la fase de apilamiento y 30 mA para la fase de separación. Las electrotransferencias se realizaron en una cuba MiniProtean II (BioRad, Hercules, CA, EEUU), con la misma fuente a 300 mA durante una hora sobre una membrana de nitrocelulosa (Osmonics, Westboro, MA, EEUU). Para corroborar la efectividad de la transferencia se realizó una tinción de la membrana con una solución de rojo Ponceau – ácido tricloroacético. Se realizó en todos los casos un paso de bloqueo con TBS Tween 0,1% y 5% de leche descremada 1h a 37°C. Las incubaciones con anticuerpos se realizaron en TBS Tween 0,1% y leche descremada 1%, a excepción del estudio de caspasa-8 que se incrementó el bloqueo al 5%. Los lavados se realizaron con TBS Tween 0,1%.

Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas fueron: anticuerpo monoclonal anti-PARP1 humano (CellSignaling, cat 9532) dilución 1/1000; anticuerpo monoclonal anti-caspasa-3 humana (CellSignaling, cat 9662) dilución 1/1000; anticuerpo monoclonal anti-BIP (CellSignaling, cat 3177) dilución 1/1000; anticuerpo monoclonal anti-RIP3 (abcam, cat ab56164) dilución 1/500; anticuerpo monoclonal anti-caspasa-1 (Santa Cruz, cat sc-56036) dilución 1/1000; y anticuerpo monoclonal

anti-caspasa-8 (CellSignaling, cat 9746) dilución 1/1000. Todos fueron incubados durante toda la noche a 4°C. Como control de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- β -actina en una dilución 1/4000 (Abcam, catab8227). El anticuerpo secundario utilizado fue un anti-IgG de ratón (para detectar caspasa-1 o caspasa-8) o de conejo (casos restantes), conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1/2000; BioRad). Se incubó la membrana con este anticuerpo durante 1 hora a 37°C.

Los revelados se realizaron por quimioluminiscencia. El reactivo fue luminol 0,25 mM (Fluka, St Louis, MO, EEUU), 0,2 mM ácido p-cumárico (Fluka, St Louis, MO, EEUU), 2,9 mM de peróxido de hidrógeno, 10 mM Tris pH= 8,8. Se utilizaron placas fotográficas Amersham HyperFilm MP (GE, Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), y se revelaron y fijaron manualmente con reactivos fotográficos Romek (Gamaxa SRL, Avellaneda, Argentina) según instrucciones del fabricante.

Los análisis de imágenes para cuantificación relativa de densidad óptica se realizaron con la herramienta de análisis de geles del software ImageJ. Se cuantificó la densidad óptica en la banda de interés correspondiente a la proteína en estudio y se normalizó respecto al valor correspondiente a β -actina. Finalmente se promedió el valor de expresión en el grupo control y dicho promedio fue utilizado como normalizador para todas las muestras.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Las comparaciones de niveles de expresión de ARNm o proteína entre los grupos estudiados (pacientes celíacos, pacientes en DLG cuando correspondió y controles), se realizaron utilizando un test T no pareado. En los ensayos de recuento por inmunofluorescencia o TUNEL los distintos grupos también fueron comparados con un test T no pareado.

Resultados

Evaluación de los niveles de expresión de moléculas asociadas a estrés de RE

Con el objeto de evaluar indicadores de presencia de estrés de RE en mucosa duodenal, analizamos en primer lugar los niveles de ARNm de XBP1 en su forma larga o “unspliced” (XBP1u), y en su forma corta o “spliced” (XBP1s). La medida de la proporción entre ambas formas permite estimar la actividad del sensor de estrés IRE1, cuya actividad endonucleasa es la responsable de la generación del fragmento XBP1s a partir del XBP1u. Los niveles de ARNm de XBP1 en las formas “u” y “s” fueron evaluados en muestras duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico, en DLG y controles, y fue calculada la proporción de XBP1s respecto al total. Este parámetro fue evaluado en población pediátrica y adulta por separado, pero no se observaron diferencias entre ambas (**Figura 48a**). El mismo análisis entre poblaciones se realizó para el resto de los marcadores estudiados. Dado que en ningún caso se registraron diferencias entre la distribución de los resultados en muestras de población adulta y pediátrica, por simplicidad los resultados son mostrados en adelante, en forma conjunta.

La evaluación de la relación XBP1s respecto al total (XBP1s y XBP1u) no mostró diferencias significativas en las poblaciones estudiadas pero se aprecia una leve tendencia de mayores niveles en pacientes celíacos al diagnóstico comparado con controles o pacientes en DLG (**Figura 48b**). El análisis de los niveles de XBP1u y s por separado no mostró diferencias significativas cuando se comparan muestras de población control, celíacos al diagnóstico y en DLG (**Figura 48c y d**).

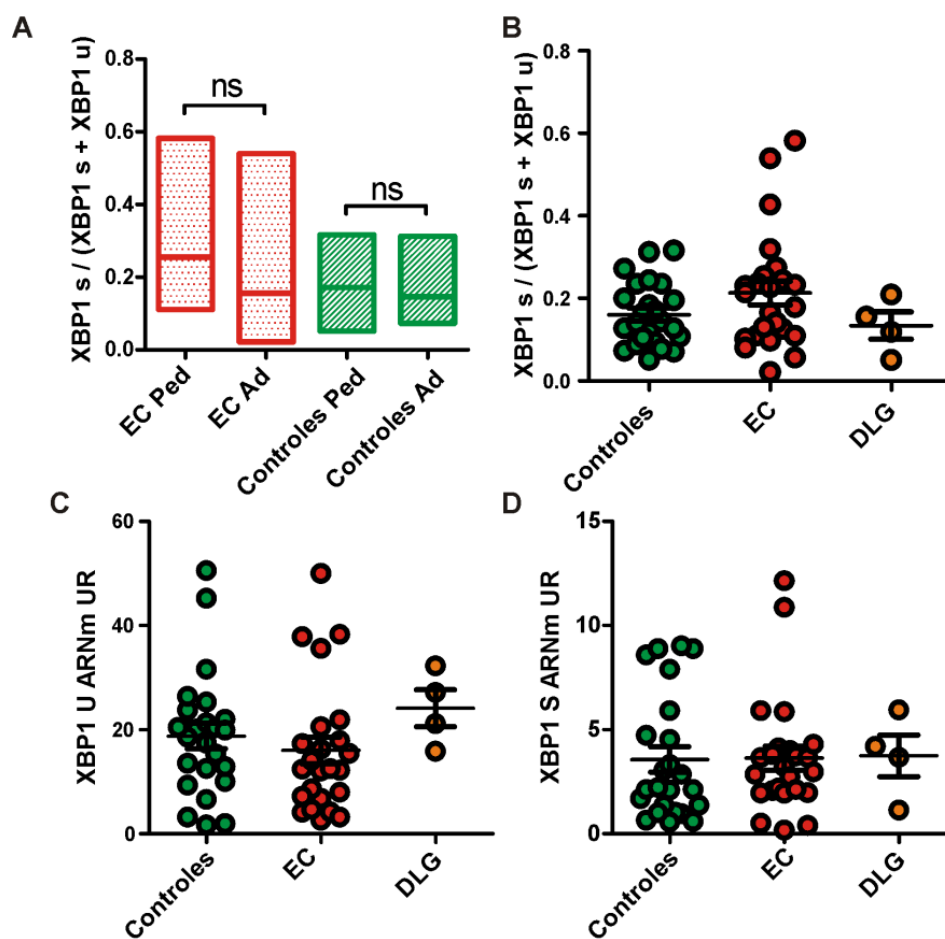


Figura 48. Determinación de los niveles de ARNm de XBP1 por PCR cuantitativa en biopsias duodenales. **A)** Niveles de ARNm de XBP1s respecto al total (XBP1s+XBP1u) en controles y celíacos al diagnóstico de población adulta y pediátrica. Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas (ns). **B)** Niveles de XBP1s respecto al total en controles (n=24), celíacos al diagnóstico (n=24) y pacientes en DLG (n=4). Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas. **C y D)** Niveles de XBP1u y XBP1s, respectivamente, en controles, celíacos al diagnóstico y pacientes en DLG. Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas. Niveles referidos a β -actina, expresados como unidades relativas (UR).

También fueron evaluados por PCR cuantitativa los niveles de ARNm de otros marcadores de estrés de retículo como CHOP, EDEM1, GRP94 y GADD34 (**Figura 49**). Los niveles de GRP94 no fueron significativamente diferentes entre muestras duodenales de población control, celíacos al diagnóstico y pacientes en DLG, sin embargo se observó una tendencia hacia mayores niveles en EC activa. El caso opuesto se observó para GADD34, donde se observó una tendencia a valores disminuidos en EC activa. Resultados similares para los niveles de GADD34 fueron descritos en íleon de pacientes con enfermedad de Crohn comparados con controles (Bogaert et al., 2011). Sin embargo, en forma inesperada, se observó que los niveles de EDEM1, chaperona componente del sistema ERAD, y CHOP, factor de transcripción proapoptótico, fueron significativamente menores

en muestras de duodeno de pacientes celíacos al diagnóstico respecto a controles y a pacientes en DLG. Estos resultados no permiten una interpretación directa del fenómeno ya que la expresión de EDEM1 y GRP94 dependen de inductores en común como XBP1. Mientras que claramente los niveles de ARNm de EDEM1 están disminuidos, se observa una tendencia a un leve aumento de GRP94. Por otro lado, los menores niveles de CHOP en EC activa correlacionan con la tendencia a valores más bajos en GADD34, gen blanco de este factor de transcripción.

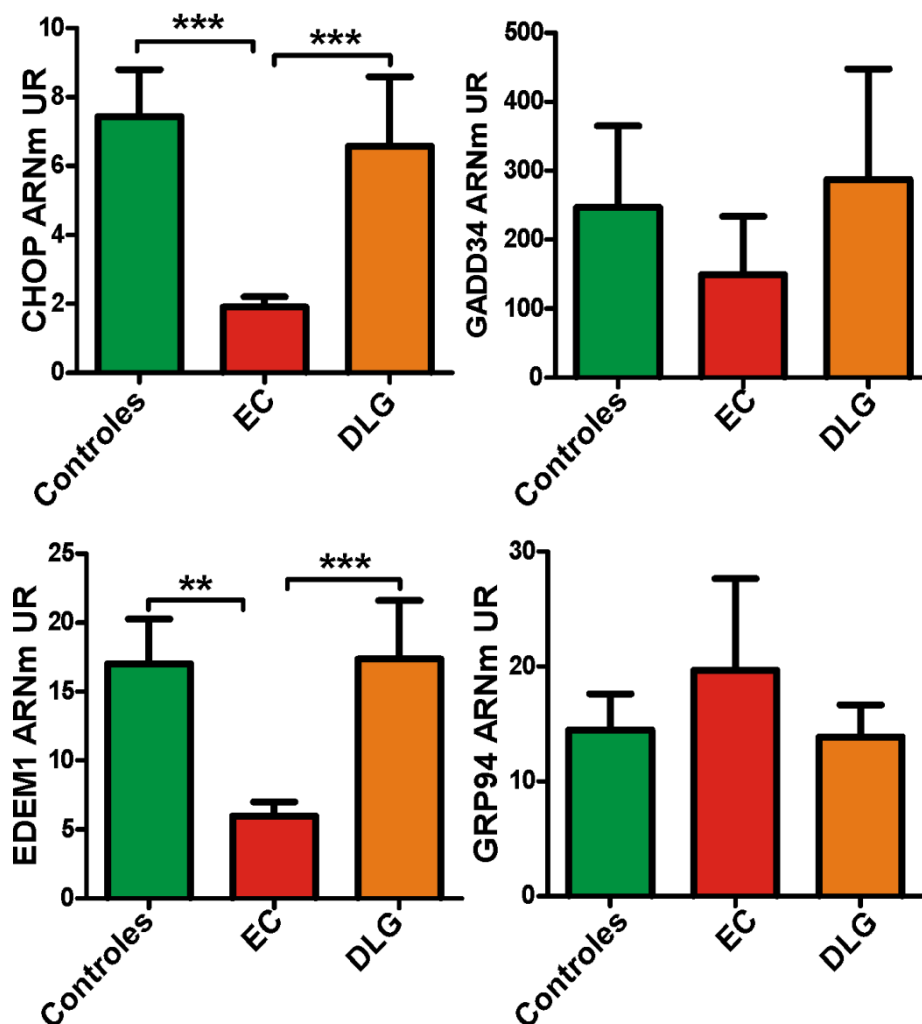


Figura 49. Niveles de expresión de moléculas asociadas a estrés de retículo en mucosa duodenal. Evaluación de la expresión a nivel de ARNm de CHOP, EDEM1, GRP94 y GADD34 por PCR cuantitativa en biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico (n=24), controles no celíacos (n=24) y pacientes en DLG (n=4). Test T no pareado; ***p<0,001; **<0,005.

Finalmente, estudiamos la expresión de BIP en biopsias duodenales. BIP es una chaperona del RE que, al estar unida a IRE1 y a PERK, reprime su homodimerización y consecuente activación. Los niveles de ARNm de BIP, determinados por PCR en tiempo real, no presentaron diferencias

significativas entre muestras de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico, controles y celíacos en DLG (Figura 50a). Sin embargo, la evaluación de la intensidad de bandas en western blot, en muestras de pacientes celíacos al diagnóstico y controles, evidenciaron un mayor contenido de BIP en biopsias duodenales de pacientes (Figuras 50b y c).

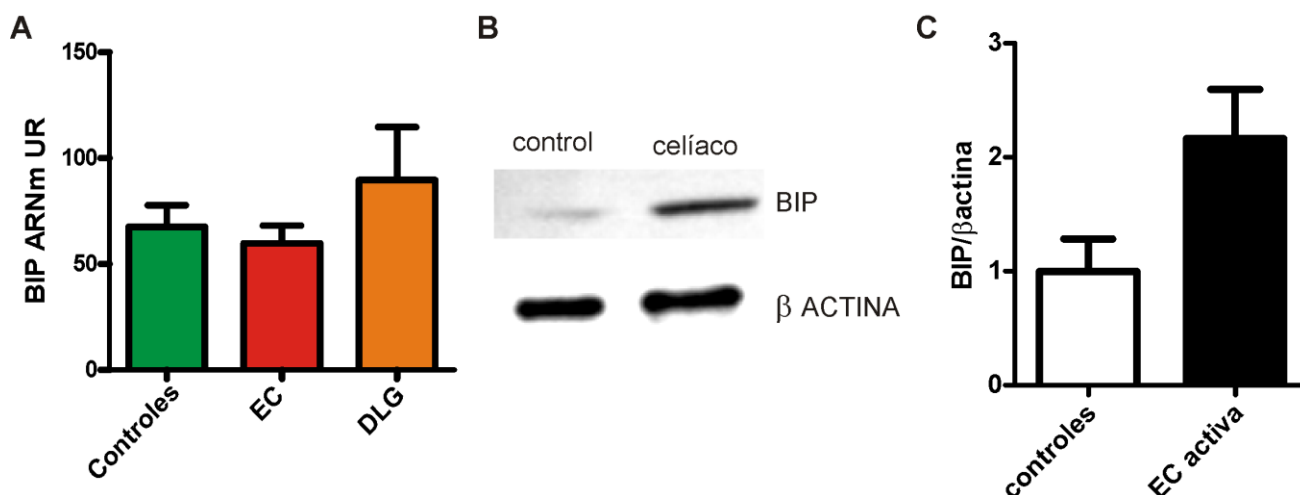


Figura 50. Análisis de la expresión de BIP en mucosa duodenal. **A)** Estudios de expresión a nivel de ARNm de BIP por PCR cuantitativa a partir de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico (n=24), controles (n=24) y pacientes en DLG (n=4). Niveles referidos a β -actina. Unidades relativas (UR). Diferencias estadísticamente no significativas. (Test T no pareado). **B)** Análisis de la expresión de BIP (78 KDa) y β actina (40 KDa) por western blot en un caso representativo de un celíaco y un control. **C)** Análisis cuantitativo de la expresión de BIP referido a β -actina por densitometría en controles (n=5) y celíacos al diagnóstico (n=5). Diferencias estadísticamente no significativas, test T no pareado.

Dado que observamos que los niveles de BIP se encuentran incrementados a nivel de proteína en mucosa duodenal en EC activa, decidimos estudiar su patrón de expresión mediante microscopía confocal de fluorescencia en cortes histológicos de biopsias duodenales. Llamativamente, las imágenes revelaron la presencia de abundantes células epiteliales BIP⁺ en pacientes celíacos no tratados, mientras que se observaron con menos frecuencia en controles o pacientes en DLG. Por otro lado, tanto controles como celíacos presentaron también células BIP⁺ en LP. Con el objetivo de identificar el linaje de estas células se empleó el marcador CD138, comúnmente usado para identificar células plasmáticas. Por doble marcación, observamos que la mayoría de las células BIP⁺ eran células plasmáticas CD138⁺. Esta observación concuerda con la inducción de estrés de retículo en las células plasmáticas como consecuencia de la elevada tasa de producción de inmunoglobulinas (Todd et al., 2008) (Figura 51a y b).

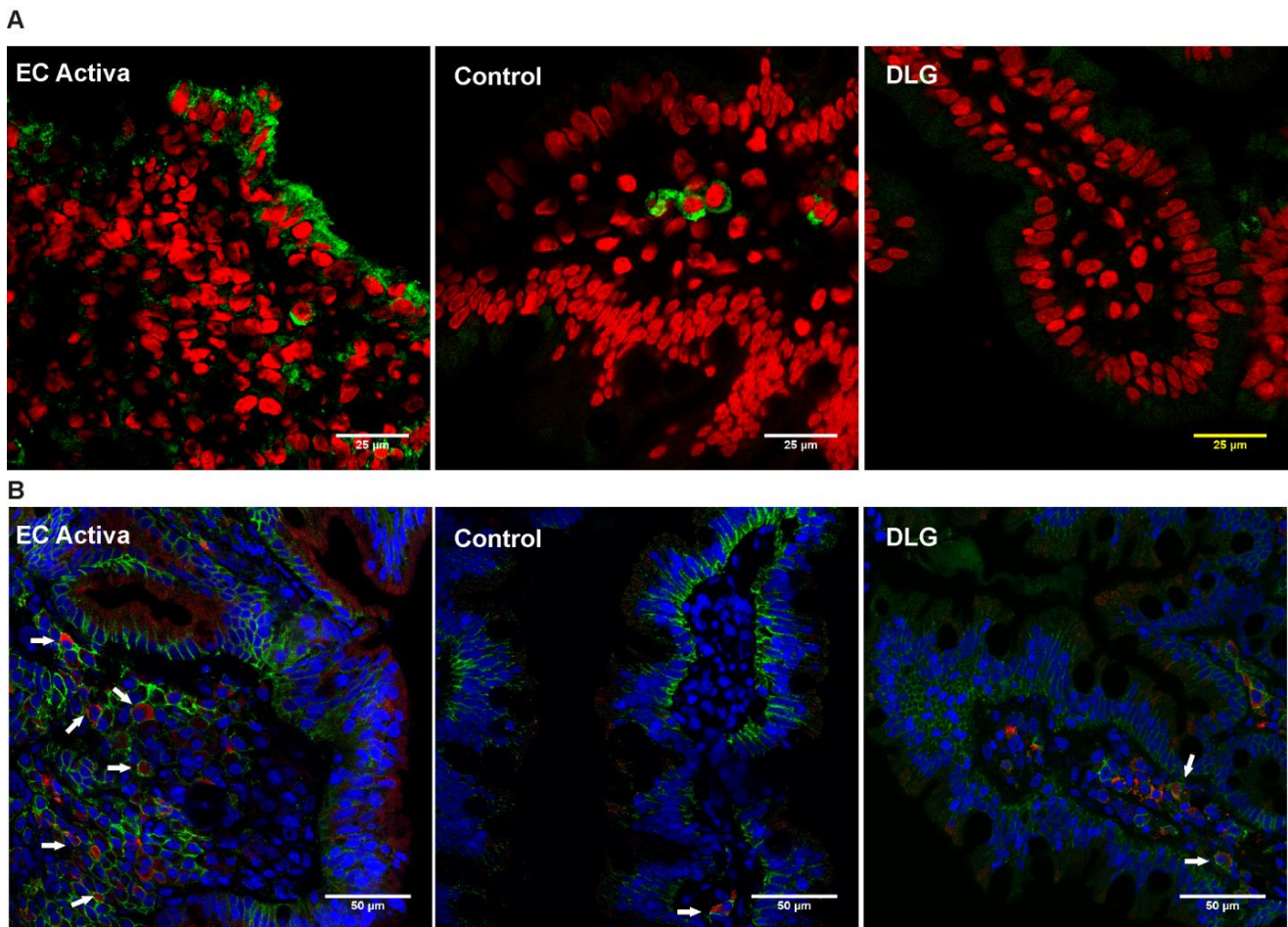


Figura 51. Caracterización del patrón de expresión de BIP por microscopía confocal de fluorescencia. A) Inmunofluorescencia y microscopía confocal para BIP (verde) y núcleos (rojo) en cortes histológicos de biopsias duodenales de un paciente celíaco al diagnóstico, un individuo control y un paciente en DLG, casos representativos. Se observa la marca en epitelio en EC activa así como células en LP. En el caso del control, solo se observan células BIP⁺ en LP. Objetivo 62x, zoom escaneo 1,7x. **B)** Doble marcación y microscopía confocal para BIP (rojo) y CD138 (verde) en biopsias duodenales de un paciente celíaco al diagnóstico, un individuo control y un paciente en DLG, casos representativos. Se observan los núcleos en azul. Las flechas señalan células CD138⁺BIP⁺. Objetivo 62x, zoom escaneo 1x.

En conjunto, estos resultados muestran que en pacientes con EC activa se observan mayores niveles de estrés de RE, en particular en el epitelio, evidenciado por la presencia de células BIP⁺. Esto es de relevancia ya que los enterocitos son el principal blanco del daño en la mucosa intestinal en EC activa. Sin embargo, el análisis de expresión a nivel ARNm de varios mediadores de las vías de estrés no permitió establecer una vía definida de señalización. En este sentido, el análisis de una pieza de tejido entera y proveniente de un proceso crónico en ocasiones genera limitaciones que impiden obtener resultados concluyentes.

Evaluación de muerte celular en mucosa duodenal

Se evaluó la presencia de células TUNEL⁺ en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico y controles no celíacos. Contrariamente a lo esperado según los modelos propuestos de muerte exacerbada de enterocitos, no se observaron células epiteliales positivas para TUNEL en pacientes celíacos al diagnóstico. En cambio, se observaron con alta frecuencia células TUNEL⁺ en LP en muestras de duodeno con enteropatía severa comparado con tejido normal (**Figura 52**). Para obtener un resultado cuantitativo procedimos al recuento de células TUNEL⁺ por unidad de área de LP. El análisis del número de células TUNEL⁺, cuando se consideran todas las muestras analizadas independientemente del grupo etario, muestra un incremento significativo en celíacos al diagnóstico comparado con controles (**Figura 53a**). Además, evidenciamos que no hay diferencias significativas cuando se realiza el análisis de población pediátrica y adulta por separado (**Figura 53b**).

Dado que ocasionalmente se evidenciaron células TUNEL⁺ en las criptas, realizamos un análisis cuantitativo en este sector. El número de células TUNEL⁺ en criptas expresado como enterocitos TUNEL⁺ cada 100 enterocitos no reveló diferencias entre los grupos evaluados en forma separada por edad o en su conjunto (**Figura 54**).

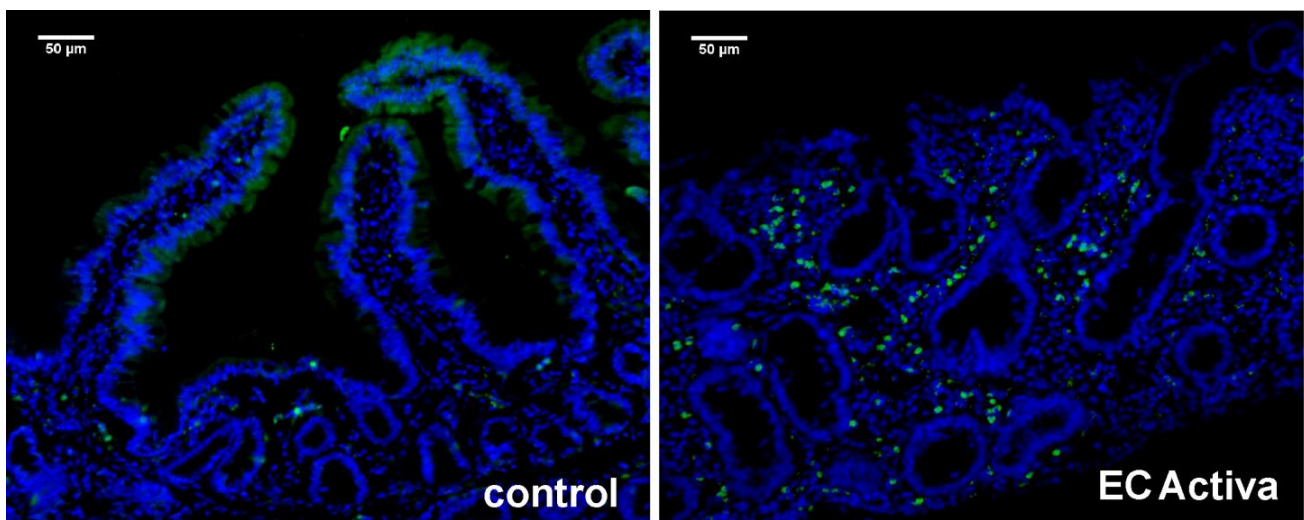


Figura 52. Muerte celular en mucosa duodenal. Estudios mediante técnica de TUNEL por microscopía de fluorescencia en cortes histológicos de biopsias duodenales de población control y celíacos al diagnóstico, se muestran casos representativos. Se observa en verde la reacción positiva y en azul los núcleos.

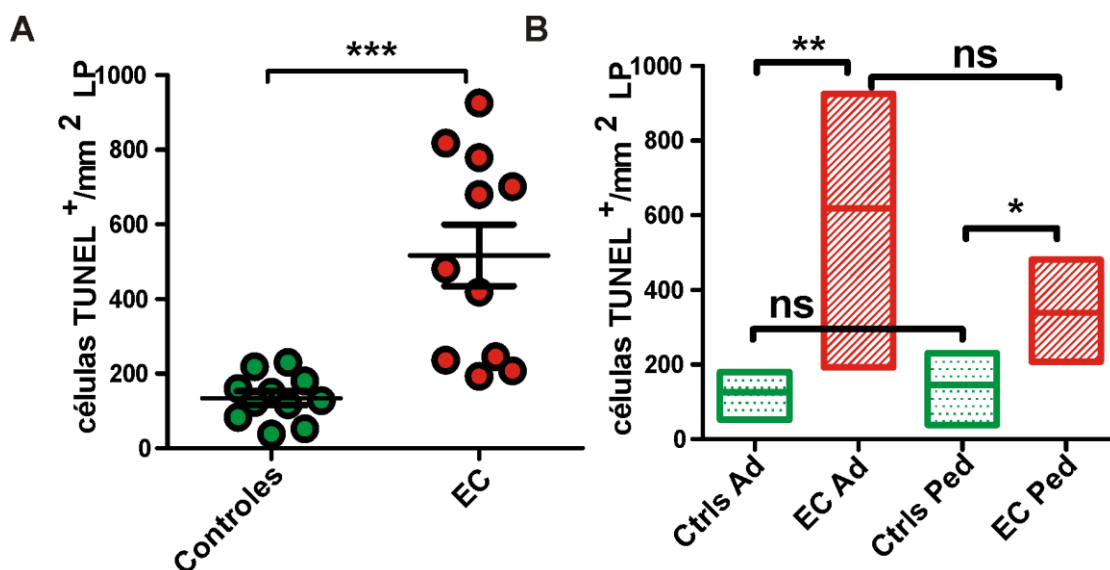


Figura 53. Recuento de células TUNEL⁺ en lamina propia. A) Recuento de células TUNEL⁺ por unidad de área de LP en biopsias duodenales de población control (n=11) y pacientes celíacos al diagnóstico (n=11). Test T no pareado, ***p<0,001. B) Recuento de células TUNEL⁺ por unidad de área de LP en biopsias duodenales de población control y pacientes con EC activa diferenciado entre población adulta (Ad) y pediátrica (Ped). Controles: 7 adultos y 4 pediátricos; celíacos: 6 adultos y 5 pediátricos. Test T no pareado, *p<0,05; **p<0,01.

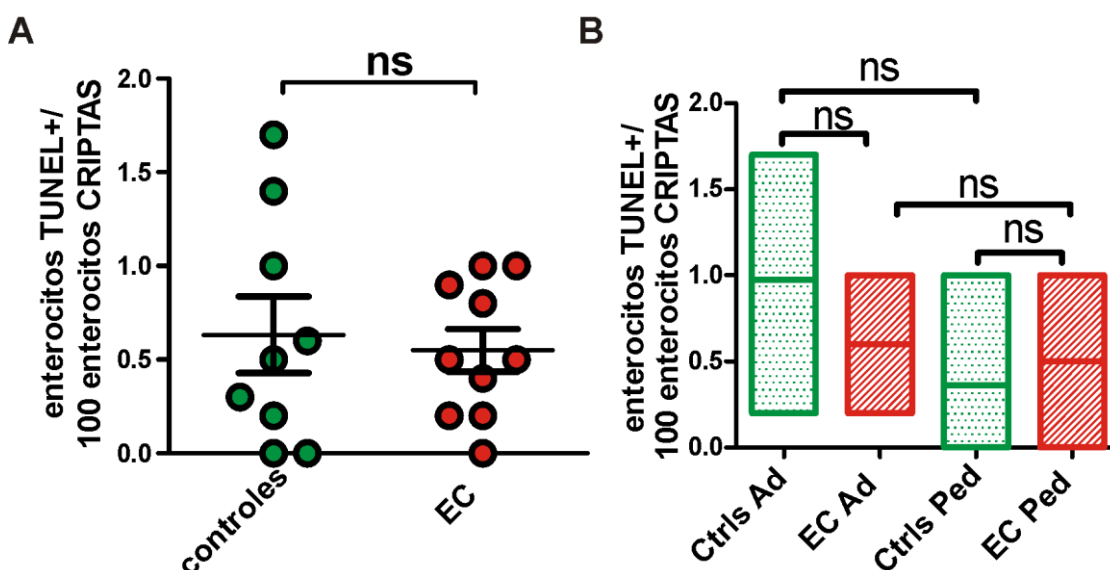


Figura 54. Recuento de células TUNEL⁺ en criptas. A) Recuento de enterocitos TUNEL⁺ cada 100 enterocitos en criptas en biopsias duodenales de controles (n=9) y pacientes con EC activa (n=10). Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas. B) Recuento de enterocitos TUNEL⁺ cada 100 enterocitos en criptas en biopsias duodenales de controles y pacientes con EC activa de población pediátrica (Ped) y adulta (Ad). Controles: 4 adultos y 5 pediátricos; celíacos: 5 adultos y 5 pediátricos. Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas.

Estos resultados indican que en las formas más severas de la enteropatía, existe una elevada muerte celular en células de la LP pero no se observaron diferencias significativas en el epitelio

diferenciado de las vellosidades ni en las criptas. Considerando estos resultados, se evaluaron muestras con grados menores de daño. Con este fin, se analizaron muestras duodenales clasificadas como enteropatía de grado I de pacientes con clínica y serología de EC, así como muestras de pacientes celíacos en DLG. Si bien el número de muestras de pacientes celíacos con enteropatía leve fue insuficiente para una evaluación estadística, en las imágenes obtenidas no se observó un número relevante de enterocitos TUNEL⁺, mientras que el número de células TUNEL⁺ en LP y en criptas resultó variable. El análisis de muestras duodenales de pacientes en DLG (con histología normalizada) mostró resultados similares a los encontrados en población control (**Figura 55**).

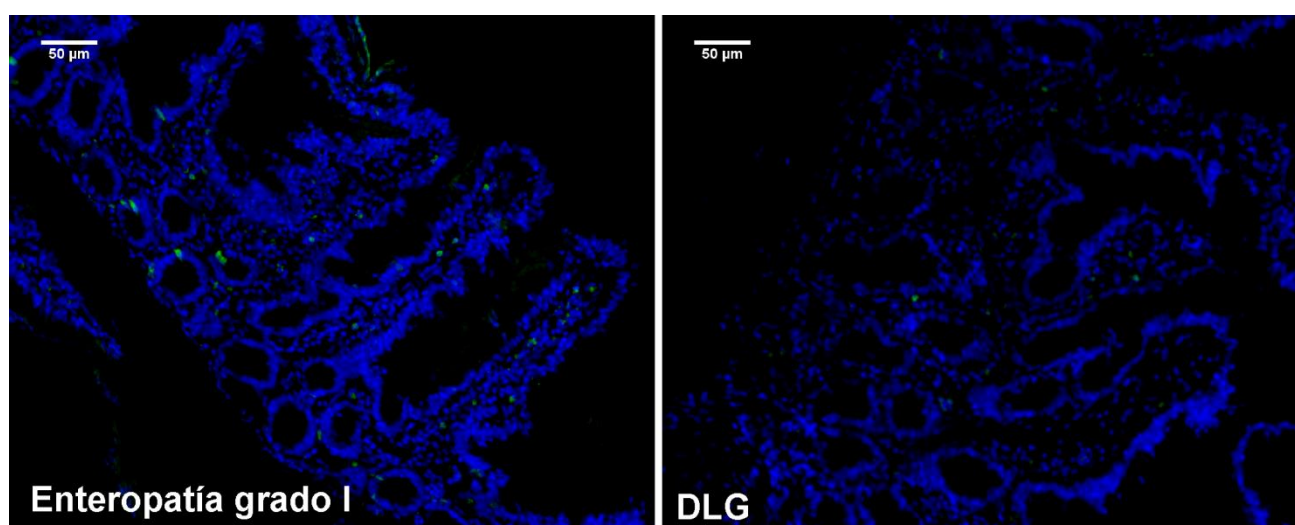


Figura 55. Análisis de muerte celular en mucosa duodenal con enteropatía intermedia y pacientes celíacos en DLG. Estudio por técnica de TUNEL por microscopía de fluorescencia en cortes histológicos de biopsias duodenales con enteropatía intermedia, grado I (**A**) y pacientes celíacos en DLG (**B**), casos representativos. Se observa en verde la reacción positiva y en azul los núcleos.

Estudio de vías apoptóticas en mucosa duodenal: expresión de caspasa-8, caspasa-3 y PARP1

Teniendo en cuenta los altos niveles de muerte celular observados mediante la técnica de TUNEL en mucosa duodenal con EC activa, nos interesó estudiar marcadores asociados a diferentes vías de muerte celular.

En primer lugar, dado que la vía extrínseca de apoptosis ha sido asociada a EC, evaluamos los niveles de caspasa-8. Los ensayos por western blot utilizando extractos proteicos de biopsias duodenales, no mostraron diferencias en la expresión de caspasa-8 clivada entre celíacos y

controles (**Figura 56**). Por razones técnicas, no pudimos evaluar la cantidad de esta proteína en su forma de procaspasa.

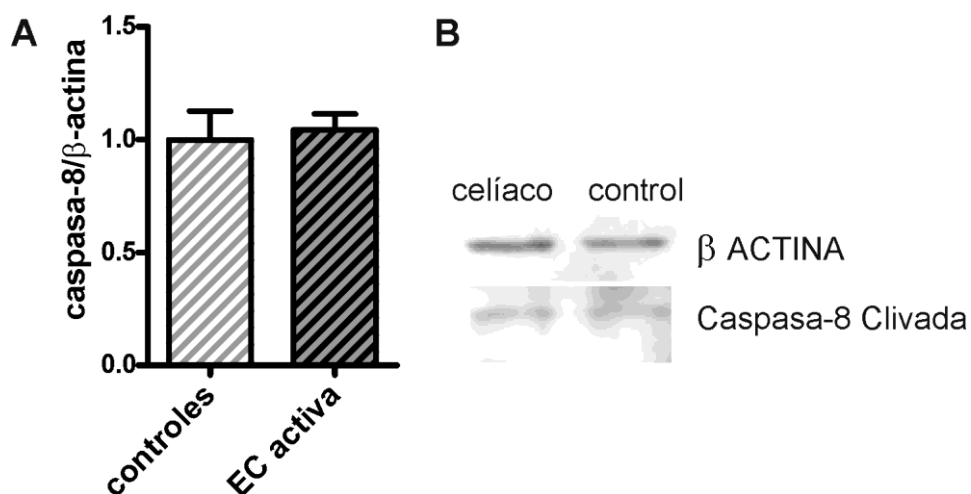


Figura 56. Expresión de caspasa-8 activa en mucosa duodenal. A) Análisis cuantitativo a partir del western blot para la expresión de caspasa-8 clivada normalizado según las cantidades de β -actina en controles y celíacos al diagnóstico (n=5 en ambos grupos). Diferencias no significativas, test T no pareado. **B)** Detección de caspasa-8 clivada (18 KDa) y β actina (40 KDa) por western blot. Se muestra un celíaco y un control representativos.

Luego, procedimos a estudiar los niveles de caspasa-3, caspasa efectora involucrada en las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca. Los niveles de expresión de caspasa-3, tanto en su forma de procaspasa como su forma activa clivada, fueron analizados por western blot en extractos proteicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos y de controles no celíacos.

Los resultados fueron variables y no se detectaron diferencias significativas entre celíacos y controles, aunque se observó una tendencia hacia mayores niveles de caspasa-3 clivada en pacientes celíacos (**Figura 57**). Por otro lado, los estudios por microscopía confocal utilizando un anticuerpo específico para la caspasa-3 en su forma clivada, revelaron la presencia de células positivas de forma aislada en la LP de la mucosa intestinal, tanto en pacientes celíacos como en controles. Es de destacar que en ninguno de los casos evaluados mediante esta técnica fue posible distinguir células del epitelio positivas para caspasa-3 clivada (**Figura 58**).

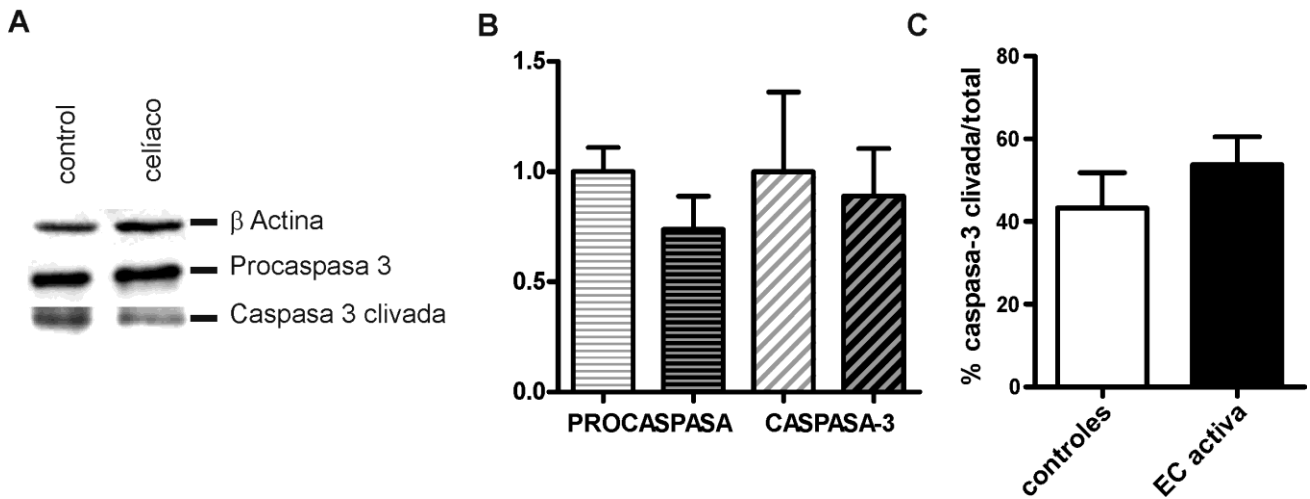


Figura 57. Expresión de caspasa-3 en biopsias duodenales. **A)** Análisis por western blot de la expresión de caspasa-3 (procaspasa: 35 KDa, caspasa clivada: 17 KDa) y del control del carga, β -actina (40 KDa). Se muestran un celiaco y un control representativos. **B)** Análisis de los niveles de expresión de procaspasa-3 y caspasa-3 clivada, normalizados a β -actina, en 5 celiacos (fondo negro) y 5 controles (fondo blanco). No se observan diferencias estadísticamente significativas, test T no pareado. **C)** Se muestra el análisis como porcentaje de caspasa-3 clivada respecto al total (ambas formas) en el mismo conjunto de muestras. Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas.

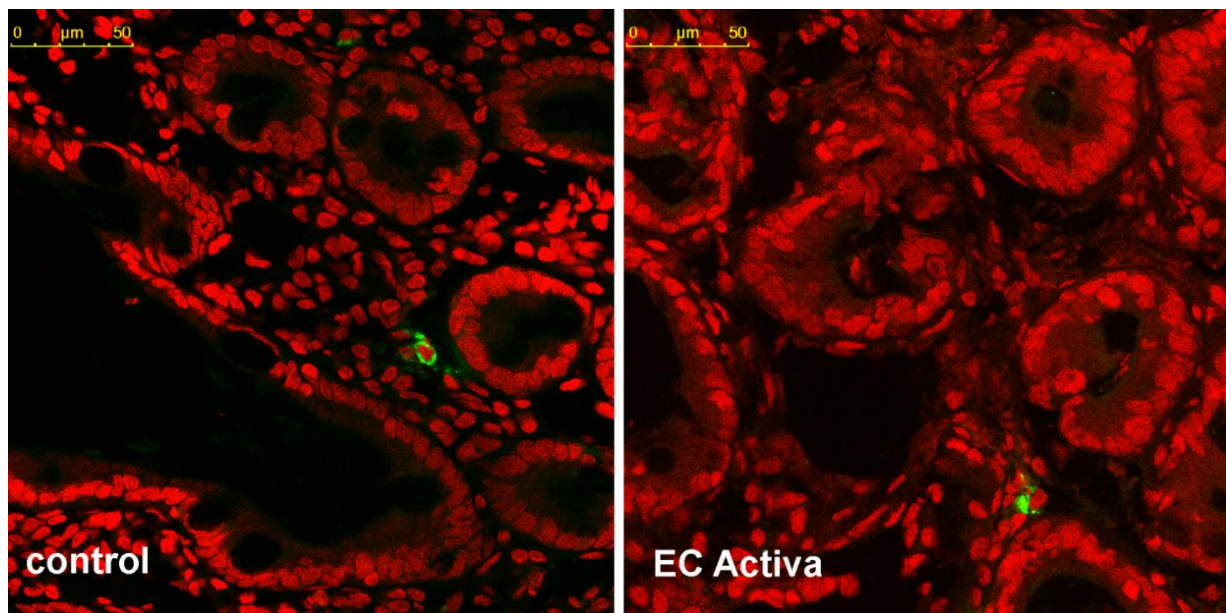


Figura 58 Estudio por microscopía confocal de caspasa-3 en mucosa duodenal. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal a partir de cortes histológicos de biopsias duodenales de celiacos y controles. Se observa caspasa-3 clivada en verde y núcleos en rojo. Objetivo 62x, zoom escaneo 1x.

Finalmente, estudiamos la expresión de caspasa-3 clivada por citometría de flujo en células aisladas del compartimento epitelial proveniente de biopsias duodenales. Observamos que la

intensidad de fluorescencia media (IFM) para la marcación de caspasa-3 clivada fue similar en células del compartimento epitelial provenientes de muestras de pacientes celíacos como en controles (**Figura 59**).

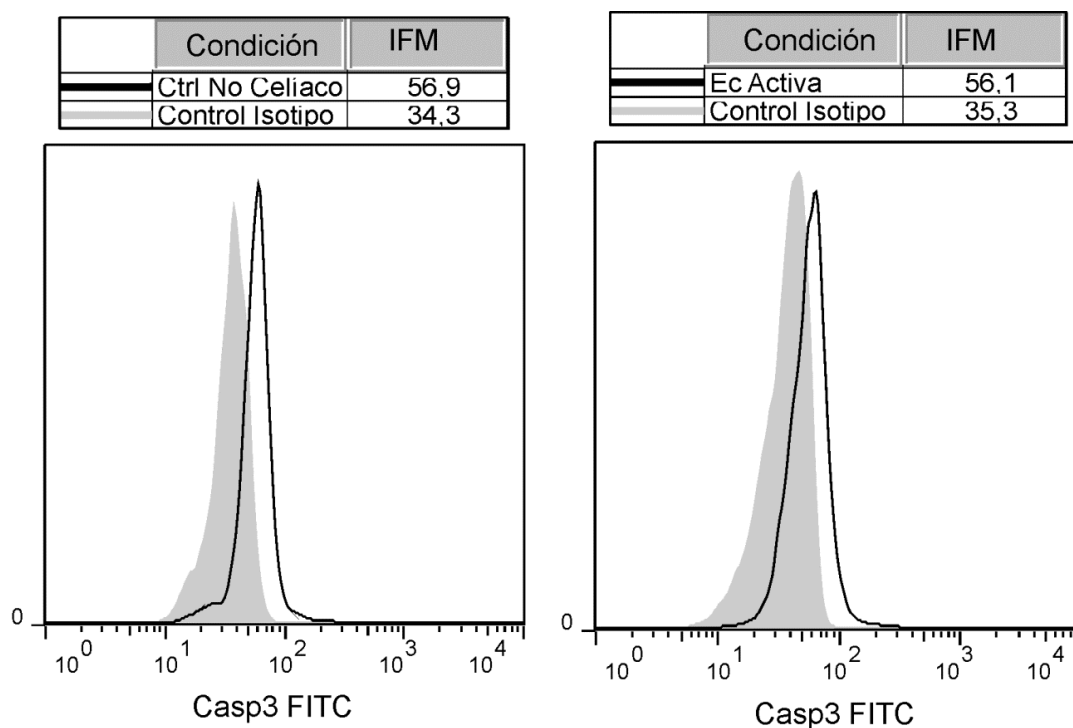


Figura 59. Análisis de los niveles de caspasa-3 clivada en células epiteliales. Estudio de la expresión de caspasa-3 clivada por citometría de flujo a partir de células aisladas del compartimento epitelial de biopsias duodenales de un paciente celíaco y un control. Se muestra los niveles de expresión de caspasa-3 clivada en células provenientes del compartimento epitelial en un *gate* donde se excluyó la región de LIEs.

En línea con los estudios de caspasa-3, y dado que técnicamente resulta difícil evidenciar diferencias en el clivaje de la misma, se procedió a evaluar uno de sus sustratos, PARP1. Caspasa-3 cliva a PARP1 resultando en dos fragmentos: un fragmento con el dominio catalítico de 89 kDa, que pierde capacidad de unión al ADN y es liberado al citosol, y otro de 24 kDa que queda unido al ADN y por lo tanto retenido en el núcleo, impidiendo a su vez, el accionar de mecanismos de reparación (Chaitanya et al., 2010).

Mediante estudios por western blot a partir de extractos proteicos de biopsias completas, no fue posible evidenciar la presencia del fragmento de 89 KDa correspondiente al clivaje de PARP1 por caspasa-3. Sin embargo, se observaron los fragmentos correspondientes a PARP1 entero (115

KDa) y, llamativamente, un fragmento de 55 KDa de marcada intensidad compatible con un producto del clivaje de PARP1 por parte de otras proteasas como Granzimas A o B.

El análisis reveló que en mucosa duodenal de pacientes celíacos el fragmento de PARP1 de 55 kDa se observa de manera más intensa que en controles, mientras que en este último grupo, la banda correspondiente a la forma no clivada es más intensa (**Figura 60a**). El análisis cuantitativo no mostró diferencias estadísticamente significativas pero sí confirmaron la tendencia hacia una mayor presencia de PARP1 55 kDa en mucosa de individuos celíacos (**Figura 60b y c**).

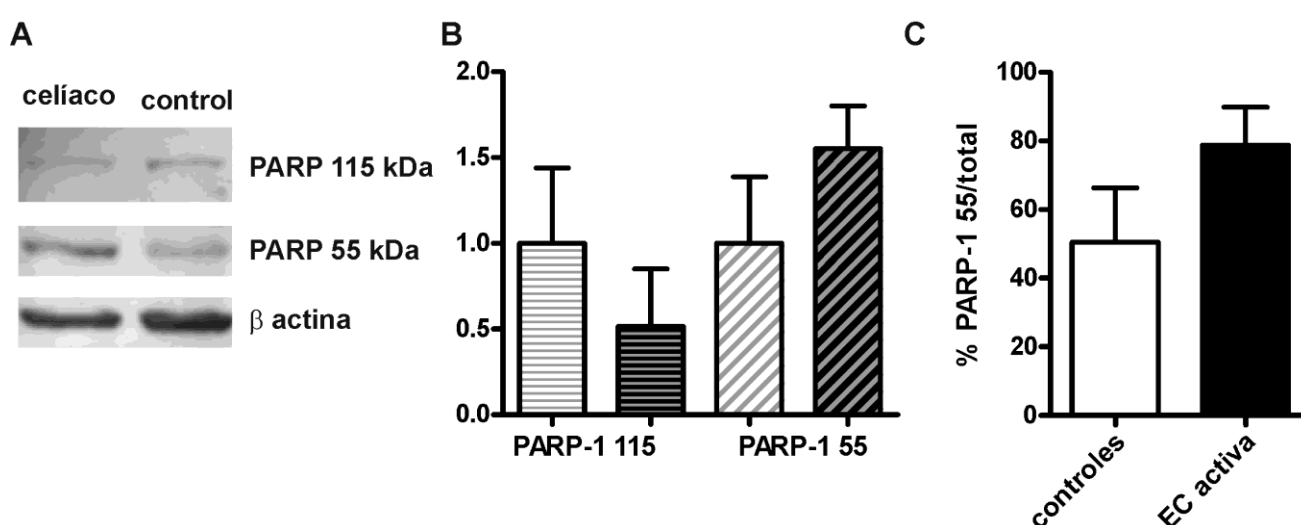


Figura 60. Análisis de la expresión de PARP1 en mucosa duodenal. **A)** Expresión de PARP1 a nivel de proteína mediante western blot en muestras duodenales de un celíaco y control, casos representativos. **B)** Análisis cuantitativo de la expresión de cada fragmento normalizado con β -actina en controles (fondo blanco, n= 5) y celíacos al diagnóstico (fondo negro, n=5). Test T no pareado, diferencias no significativas. **C)** Se muestra la proporción de PARP1 clivado (55 kDa) respecto al total en las mismas muestras. Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas.

Determinación de los niveles de BAX, BCL2, FAS y FASL en biopsias duodenales

Con el objeto de estudiar otras moléculas involucradas en las vías de apoptosis, analizamos por PCR cuantitativa los niveles de expresión en mucosa duodenal de FAS y FASL. Estas moléculas, vinculadas a la vía extrínseca, no presentaron diferencias significativas entre celíacos y controles. También evaluamos los niveles de ARNm de los factores regulatorios a nivel mitocondrial BAX y BCL2. Aunque no se observó una diferencia significativa, encontramos que el cociente proapoptótico BAX/BCL2 mostró una tendencia a estar disminuido en celíacos respecto a controles

(probablemente a expensas de un mayor nivel en ARNm de BAX) (Figura 61). Se debe considerar que este análisis es orientativo ya que solo se realiza una evaluación a nivel de ARNm y no tenemos evidencia de las vías que pueden estar verdaderamente activas en la mucosa.

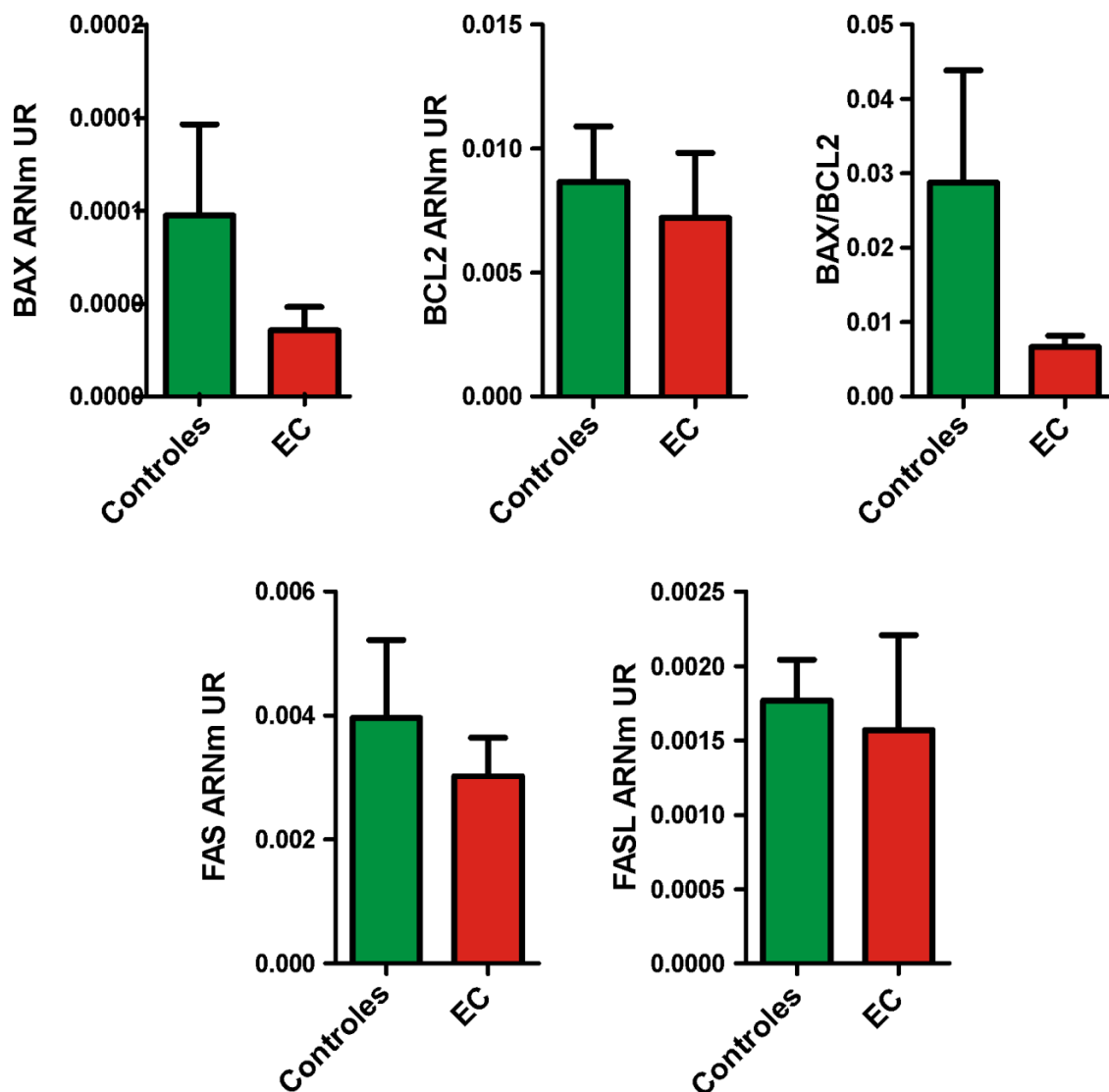


Figura 61. Análisis de marcadores involucrados en rutas apoptóticas por PCR cuantitativa. Estudios de expresión a nivel de ARNm de BAX, BCL2, FAS y FASL por PCR cuantitativa en biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico (n=24) y controles (n=24). Niveles referidos a β -actina. Unidades relativas (UR). Se muestra también la expresión de BAX y BCL2 como cociente proapoptótico (expresión relativa BAX/BCL2). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Test T no pareado).

Análisis de la expresión de RIPK3 en mucosa duodenal

Con el objetivo de evaluar la participación de otra vía de muerte celular en mucosa duodenal, procedimos a analizar la expresión de RIPK3, una de las moléculas clave en vías de muerte por necroptosis. Por microscopía confocal observamos células aisladas RIPK3⁺ en LP, tanto de tejido

normal como con enteropatía, con una frecuencia similar (**Figura 62**). La expresión de RIPK3 se observó mayoritariamente restringida a células de las criptas, y en especial a aquellas de localización basal. Aunque no fueron identificadas en nuestro estudio, se ha mostrado que estas serían células de Paneth (Günther et al., 2011). Por el escaso número de muestras analizadas, no pudimos realizar un estudio cuantitativo mediante esta técnica.

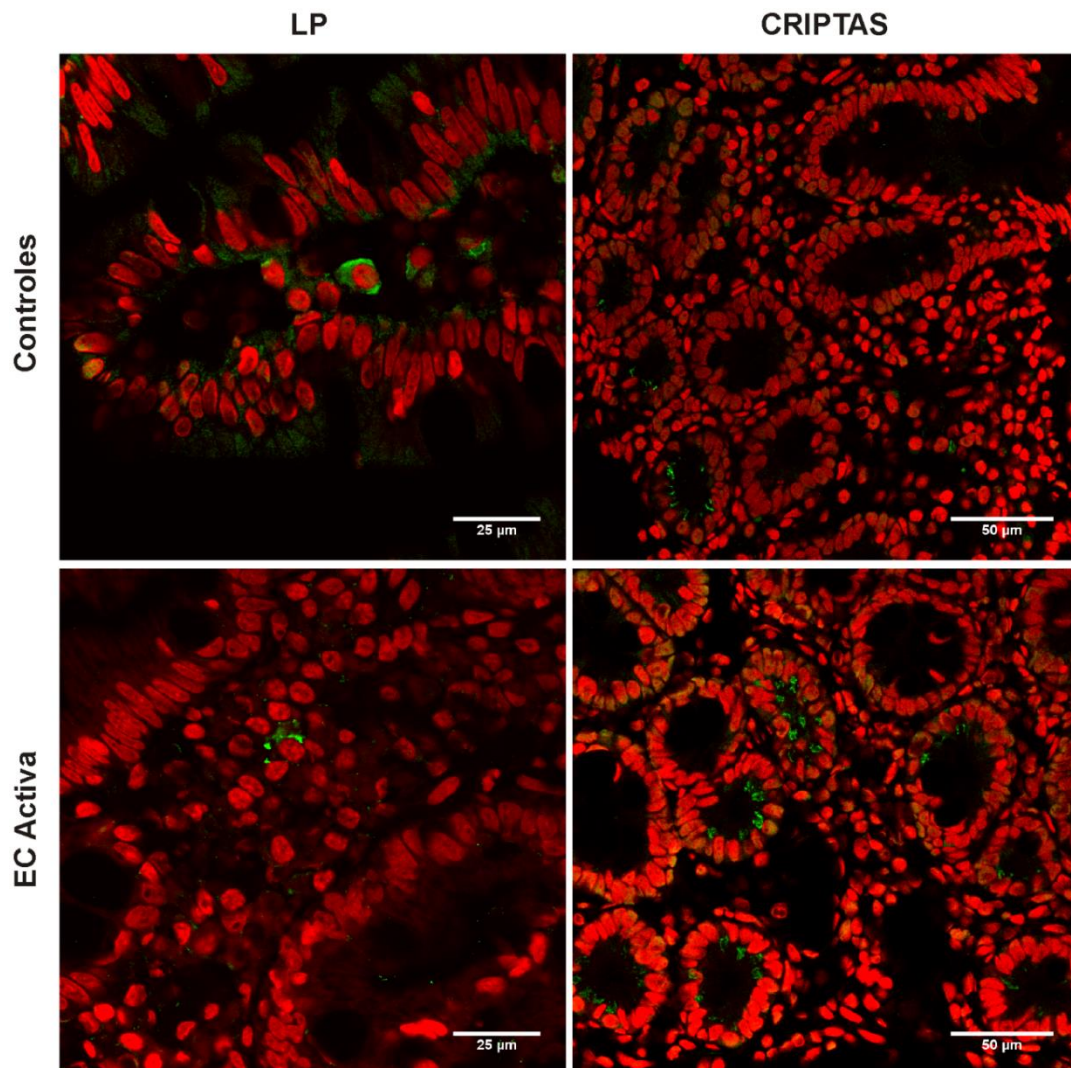


Figura 62. Análisis de la expresión de RIPK3 en biopsias duodenales por microscopía confocal. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal a partir de cortes histológicos de biopsias duodenales de celíacos y controles, correspondientes a zonas de LP y de criptas. Se observa RIPK3 en verde y núcleos en rojo. Objetivo 62x, zoom de escaneo 1,7x y 1x, respectivamente.

Con el fin de obtener resultados cuantitativos, procedimos a analizar por western blot la presencia de RIPK3 en extractos proteicos obtenidos a partir de biopsias duodenales. Estos ensayos

evidenciaron la presencia de dos fragmentos de diferente peso molecular específicos de RIPK3: por un lado aquel correspondiente a la molécula entera (55 KDa) y por otro, un fragmento de menor peso molecular (32 KDa) compatible con un producto de clivaje por parte de caspasa-8, tal cual fue descrito (Feng et al., 2007). En este estudio el número de muestras fue reducido y no se observaron diferencias significativas, aunque se observó una tendencia hacia menores niveles de RIPK3 en celíacos respecto a controles, tanto en su forma entera como clivada. No obstante, la proporción de clivado respecto al total no varió entre celíacos y controles (**Figura 63**), resultado que sería coherente con la presencia de niveles similares de caspasa-8 en ambos tipos de tejido observada previamente.

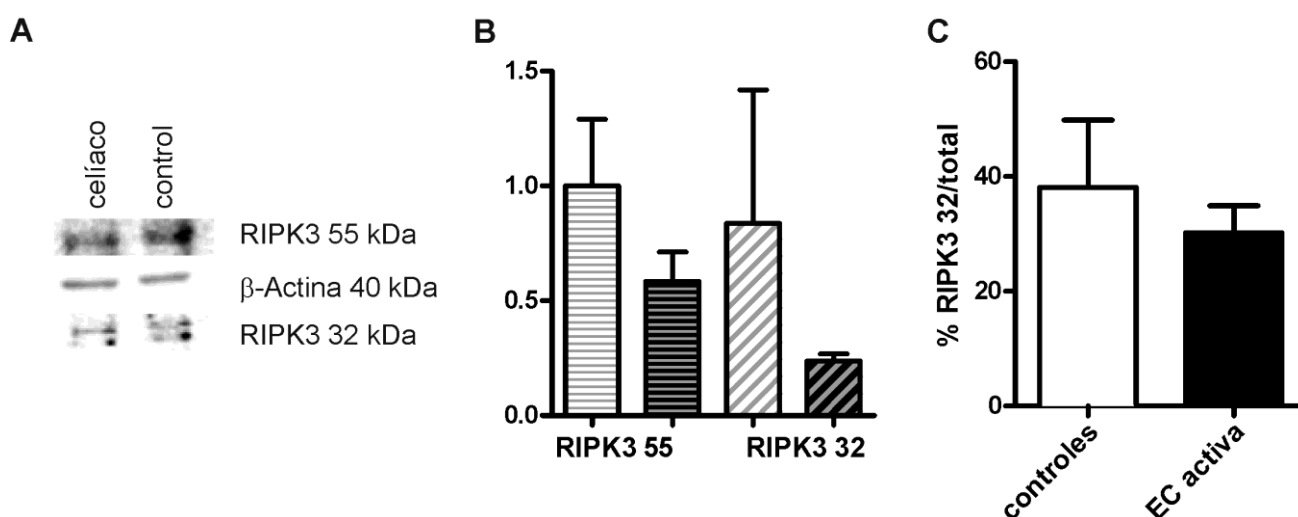


Figura 63. Expresión de RIPK3 y el producto de su clivaje en mucosa duodenal. **A)** Expresión de RIPK3 a nivel proteína mediante western blot en muestras provenientes de un celíaco al diagnóstico y un control, casos representativos. **B)** Análisis cuantitativo de la expresión de cada fragmento normalizado según las cantidades de β -actina en 3 celíacos (fondo negro) y 3 controles (fondo blanco). **C)** Se muestra la proporción de proteína clivada (32 kDa) respecto al total. Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas.

Análisis de la expresión de caspasa-1 en mucosa duodenal

Diferentes vías inflamatorias y de muerte celular comparten factores, hecho que en ocasiones dificulta la identificación unívoca del rol de una determinada vía. Entre estos casos se encuentra caspasa-1. La activación de caspasa-1 a partir de su proforma ocurre por la activación del complejo llamado inflammasoma. Tanto receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos o a daño (MAMPs y DAMPs, respectivamente) pueden activar este complejo con la consecuente formación de caspasa-1 activa. Esta caspasa tiene como sustrato pro-IL1 β , y por

ende es capaz de generar IL-1 β activa y de ahí su importante rol en inflamación. La otra citoquina activada por caspasa-1 es IL-18. A su vez, esta caspasa comparte sustratos con caspasas iniciadoras de la apoptosis, como son caspasa-3 y Bid; a través de los cuales se conecta con vías de muerte por apoptosis (Denes et al., 2012).

Nuestro interés fue evaluar los niveles de la procaspasa y la forma activada de caspasa-1 en mucosa duodenal. Para esto realizamos ensayos por western blot analizando extractos proteicos obtenidos de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico y controles, lo que nos permitió observar una leve tendencia hacia mayores niveles de caspasa-1 activa en pacientes con enteropatía (Figura 64).

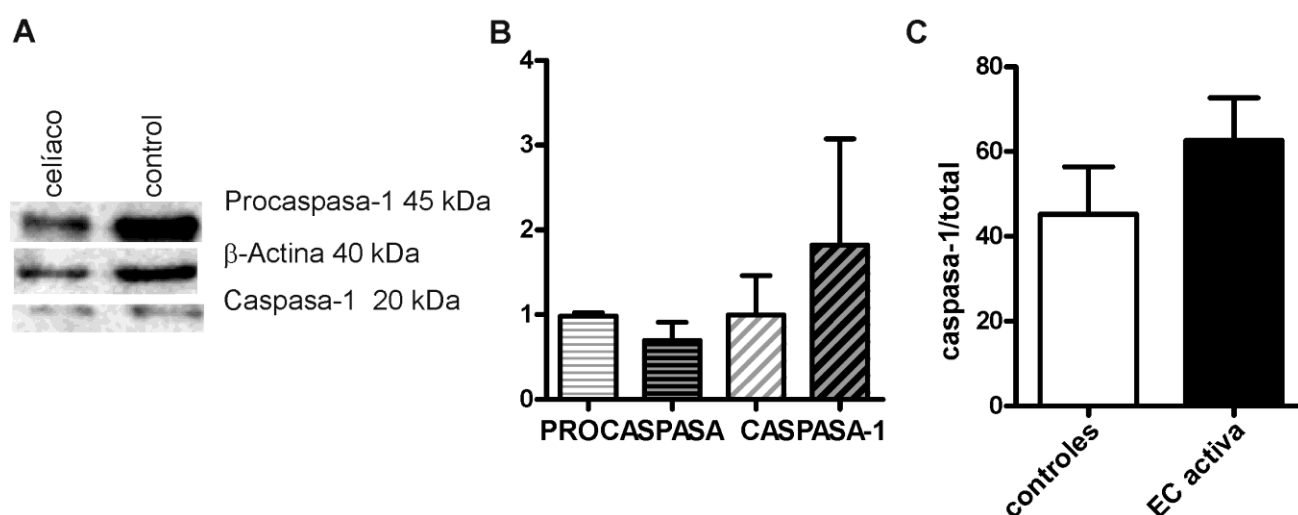


Figura 64. Análisis de la expresión de caspasa-1 en mucosa duodenal. **A)** Se analizaron por western blot extractos proteicos de biopsias duodenales de pacientes controles y celíacos al diagnóstico. Se muestran imágenes representativas de la detección de caspasa-1 en su forma procaspasa y activa para un paciente y un control representativos. **B)** Análisis cuantitativo de la expresión de procaspasa-1 y caspasa-1 clivada normalizado según las cantidades de β -actina en controles (fondo blanco; n=3) y celíacos (fondo negro; n=3). **C)** Se muestra la proporción de proteína clivada respecto al total. Test T no pareado, diferencias estadísticamente no significativas.

Evaluación de la proliferación celular en mucosa duodenal

Los mecanismos de daño en la mucosa intestinal se acompañan en general de una intensa respuesta proliferativa. Este es un mecanismo de reparación fisiológico. Dado que EC es una enteropatía crónica severa, nos interesó evaluar la respuesta proliferativa frente al estímulo de daño continuo, como lo es la ingesta de proteínas de gluten en pacientes celíacos. Los niveles de proliferación celular en la mucosa intestinal se evaluaron mediante el marcador Ki67 por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se observó un alto número de células Ki67⁺ en células

de criptas, con tendencia a encontrarlas más frecuentemente en la base de las mismas, tanto en controles como en celíacos (Figura 65a). Las imágenes provenientes de biopsias duodenales de población adulta y pediátrica fueron similares, sin embargo, el análisis cuantitativo mostró una tendencia hacia un número mayor de células en proliferación en muestras de población adulta. En adultos, se observó un mayor porcentaje de enterocitos Ki67⁺ en la población celíaca, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa con controles del mismo grupo etario. Claramente, el número de células Ki67⁺ fue mayor en población celíaca adulta comparada con la pediátrica (Figura 65b).

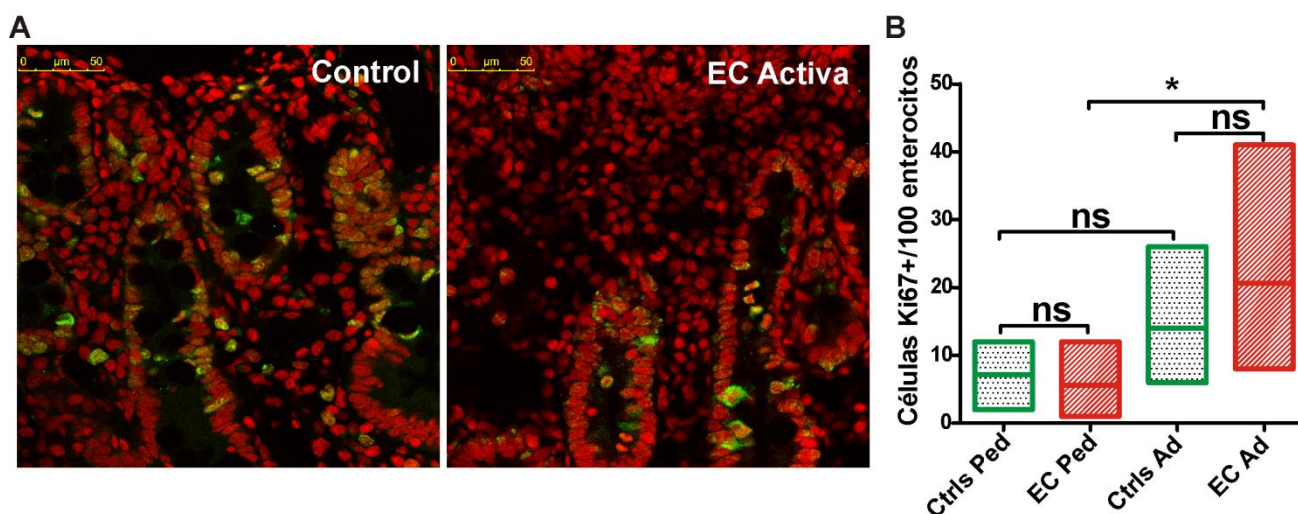


Figura 65. Proliferación celular en mucosa duodenal: análisis sobre enterocitos de criptas. Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal para la marcación de Ki67 en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico y controles. **A)** se observan imágenes representativas de criptas de un paciente con EC activa y un control, ambos adultos. Se observa en verde Ki67 y en rojo los núcleos. **B)** Recuento de enterocitos Ki67⁺ en criptas sobre muestras de pacientes celíacos al diagnóstico (5 adultos y 5 pediátricos) y controles (3 adultos y 5 pediátricos), diferenciando población adulta (Ad) de pediátrica (Ped). Test T no pareado; *p<0,05.

En términos generales, las células en estadio de proliferación activa pueden corresponder a enterocitos o a linfocitos activados. Por esta razón, también evaluamos el número de células Ki67⁺ en LP. El análisis por microscopía confocal mostró un alto número de células Ki67⁺ en LP, en particular en pacientes celíacos (Figura 66a). Aunque el recuento de células Ki67⁺ por unidad de área de LP no arrojó diferencias significativas entre celíacos y controles, se observó una tendencia hacia un mayor número de células en proliferación en mucosa intestinal de pacientes celíacos, fenómeno que fue común a ambas poblaciones, pediátrica y adulta (Figura 66b). Estos resultados pueden corresponderse con un mayor número de linfocitos T y B antígeno específicos activados y en proliferación en la mucosa duodenal de pacientes celíacos sin tratamiento.

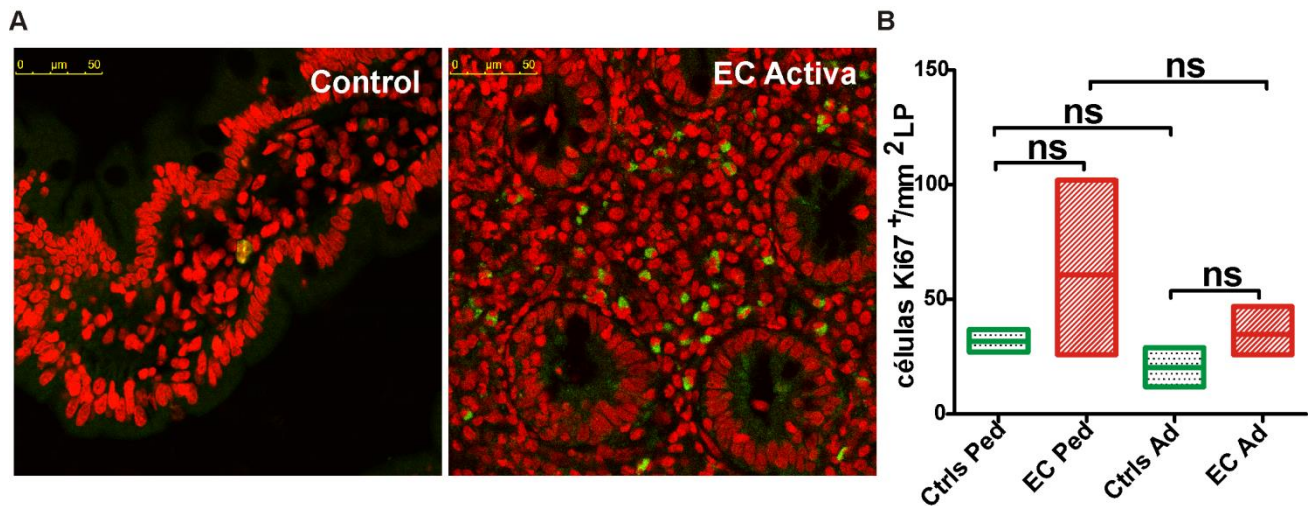


Figura 66. Proliferación celular en mucosa duodenal: análisis sobre células de LP. Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal para la marcación de Ki67 en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico y controles. **A)** se observan imágenes representativas de LP de un paciente con EC activa y un control, ambos adultos. Se observa en verde Ki67 y en rojo los núcleos. **B)** Recuento de células Ki67⁺ por unidad de área de LP sobre muestras de pacientes celíacos al diagnóstico (5 adultos y 5 pediátricos) y controles (3 adultos y 4 pediátricos), diferenciando población adulta (Ad) de pediátrica (Ped). Test T no pareado; diferencias estadísticamente no significativas.

Discusión

El daño en la mucosa de intestino delgado proximal observado en la enteropatía celíaca ha sido atribuido a la acción de linfocitos T citotóxicos sobre células del epitelio con la consecuente pérdida de enterocitos. Sin embargo, no hay estudios cuantitativos rigurosos respecto a apoptosis de enterocitos en este contexto. Nuestros estudios mediante TUNEL sobre biopsias duodenales de pacientes celíacos, no han evidenciado fragmentación de ADN en enterocitos diferenciados. Esto puede deberse a que las muestras evaluadas provienen de individuos con una atrofia vellositaria de largo desarrollo, donde ya ha ocurrido un proceso de remodelación del tejido. También hay que considerar que las células que mueren por apoptosis caen al lumen intestinal, y puede dificultarse así evidenciarlas. Cabe destacar que esta técnica pone en evidencia estadíos tardíos de la muerte celular.

Aunque el número de células TUNEL⁺ en criptas no difirió entre el grupo control y celíaco, fue notorio el incremento de células TUNEL⁺ en áreas de LP de la mucosa intestinal celíaca. Estas observaciones fueron de la mano con un mayor nivel de proliferación en LP evidenciado por el marcador Ki67, hechos que serían congruentes con una marcada actividad de células T en este compartimento con su consecuente activación, expansión y luego, autolimitación.

Con el fin de evaluar posibles mecanismos de muerte celular involucrados, estudiamos por un lado marcadores propios de la vía apoptótica extrínseca. FAS y FASL no mostraron diferencias de expresión a nivel de ARNm entre mucosa duodenal de pacientes con EC activa y controles. A su vez, tampoco se observaron diferencias en los niveles de caspasa-8 al estudiar la biopsia entera por western blot, aunque no hemos podido realizar estudios para identificar el linaje celular que la expresa. Por otro lado, evaluamos el cociente BAX/Bcl-2, el cual resultó inclinado a favor de la acción antiapoptótica en biopsias de pacientes con EC. Este resultado, fue obtenido a nivel de ARNm y debe ser interpretado entonces con cautela. Al trabajar sobre piezas de biopsia entera, la complejidad celular que poseen estas muestras, impiden la interpretación directa de estos resultados. Tal cual se mencionó, en LP de pacientes con EC hay un incremento en la tasa de muerte y proliferación celular. Es decir, coexisten ambos mecanismos en forma activa. El compartimento intraepitelial también da cuenta de mecanismos de muerte celular en enterocitos y de mecanismos de supervivencia de células efectoras como los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos,

posiblemente a consecuencia de la sobre-expresión del IL-15 en la EC, mecanismo que fue propuesto en varios estudios (Mention et al., 2003; Di Sabatino et al., 2006; Oh et al., 2008).

Tanto la vía de apoptosis extrínseca como la intrínseca convergen en la activación de la caspasa efectora 3. Nuestros ensayos de western blot sobre biopsias duodenales mostraron una leve tendencia a niveles aumentados en el clivaje de caspasa-3 en EC, aunque no evidenciaron diferencias significativas respecto a controles. Por microscopía confocal no logramos evidenciar enterocitos caspasa-3⁺ en casos con enteropatía, ni en tejido normal, mientras que por citometría de flujo los resultados evidenciaron escasas células epiteliales positivas en ambos casos. Sin embargo, por este último método sólo fue analizado un individuo celíaco y además, es muy probable que se disparen mecanismos de muerte celular durante el manejo experimental que sufre la muestra. Al estudiar PARP1, un sustrato de caspasa-3, no fue posible detectar por western blot el fragmento de 89 kDa (correspondiente al clivaje por caspasa-3). No obstante, detectamos la presencia de un fragmento de 55 kDa, compatible con la actividad de granzimas, marcadamente más elevado en mucosa duodenal de pacientes celíacos al diagnóstico. Este resultado podría reflejar una actividad de granzimas más marcada en la mucosa con EC, a consecuencia de la mayor presencia de células citotóxicas (Di Sabatino et al., 2006).

En determinadas situaciones donde las caspasas no logran ser eficientemente activadas, puede dispararse el proceso de necroptosis. El estudio de RIPK3, molécula esencial en esta vía, reveló que su expresión se observa principalmente células de las criptas, tal cual fue descrito en íleon terminal (Günther et al., 2011), pero además se observaron células aisladas RIPK3⁺ en LP, las cuales no fueron identificadas. Llamativamente, sus niveles de expresión en biopsia entera (tanto en su forma activa como inactivada por caspasa-8) presentaron una tendencia hacia niveles inferiores en EC. Estos resultados requieren estudios adicionales para lograr interpretarlos adecuadamente. Posiblemente, dado que la expresión de RIPK3 se limitaría principalmente a células de Paneth, su disminución podría relacionarse con el número de estas células en la enteropatía. Al respecto hay estudios contradictorios, pero recientemente ha sido señalado que al menos en condiciones de EC complicada (como EC refractaria) su número decrece (Di Sabatino et al., 2008). Además, IFN γ ha sido sugerido como el principal mediador de la liberación de gránulos y muerte de estas células, especialmente en duodeno (Farin et al., 2014), y es conocido el incremento de esta citoquina en EC. El estudio de la molécula RIPK1 también sería de gran

relevancia dado que recientemente se ha demostrado su rol primordial en el desprendimiento fisiológico de enterocitos en intestino delgado (Matsuoka y Tsujimoto, 2015).

En este capítulo encontramos además un incremento en la forma activa de caspasa-1 en tejido duodenal de pacientes con EC activa. Esto sugiere que esta caspasa podría estar involucrada en mecanismos de daño durante la enteropatía. Estudios previos no han podido demostrar una mayor presencia de esta proteína en duodeno de pacientes con EC aunque sí de uno de sus sustratos en su forma activa, la citoquina IL-18. No obstante IL-18 puede ser activada además por otras proteasas (Salvati et al., 2002). Otro estudio mostró una mayor expresión de caspasa-1 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EC activa y un incremento en la expresión de IL-1 β , vía caspasa-1, luego de la incubación con péptidos de gliadinas (Palová-Jelínková et al., 2013). Si bien estas observaciones sugieren la activación de vías disparadas por caspasa-1 en EC, resta evidenciar si su presencia en tejido duodenal es meramente inflamatoria o juega un rol de relevancia a través de su conexión con rutas de muerte celular.

Finalmente, hemos abordado el estudio de estrés de RE en mucosa duodenal. Nuestros resultados muestran una elevada expresión de la chaperona BIP en un marco de EC activa, lo que indicaría un tejido bajo estrés de RE. Este aumento fue detectado a nivel de proteína mientras que los niveles de su ARNm fueron relativamente similares entre celíacos y controles, probablemente debido al importante control a nivel traduccional que tiene esta proteína (Gülow et al., 2002). Por inmunofluorescencia identificamos células BIP⁺ en LP, muchas de las cuales eran células plasmáticas CD138⁺, las cuales abundan en la mucosa celíaca. Las células plasmáticas ejercen una exacerbada producción de proteínas (inmunoglobulinas), por lo que expresan una mayor cantidad de chaperonas del RE, incluida BIP, respecto a otros tipos celulares (Ma et al., 2010; Oliva y Cenci, 2014). Por lo tanto, parte del aumento en la expresión de BIP observado en biopsias de pacientes con EC puede explicarse por el marcado infiltrado de células plasmáticas durante la enteropatía. Sin embargo, también observamos otras células (no identificadas) BIP⁺ en LP y, más destacable aún, observamos enterocitos con intensa marca para BIP sólo en casos con EC activa. En línea con el aumento de BIP observamos una tendencia a mayores niveles de ARNm de otra chaperona del RE, GRP94, en biopsias de pacientes con EC activa. Tanto BIP como GRP94 pueden ser inducidas por las tres ramas de la respuesta UPR.

El estudio de la actividad endonucleasa de IRE1 a través de la relación XBP1s/XBP1s+u, no reveló diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con EC. Sin embargo, los niveles de ARNm de EDEM1 fueron significativamente menores en pacientes celíacos. EDEM1 es inducido principalmente por el factor XBP1s pero también es un gen blanco de ATF6f. De manera análoga, al estudiar la expresión de genes *downstream* PERK, encontramos la expresión de ARNm de CHOP claramente disminuidos en EC, y los de GADD34 (*downstream* CHOP) con igual tendencia.

En conjunto, estas evidencias resaltan una respuesta UPR operativamente diferente en la mucosa duodenal de pacientes con EC activa respecto al tejido normal. Cuando el estrés es leve, la célula por lo general logra neutralizar ese efecto mediante la UPR. Cuando el estrés es severo o prolongado, el mismo mecanismo deriva en apoptosis. Es decir que en la respuesta UPR se ponen en juego tanto vías de adaptación y supervivencia, como vías pro-apoptóticas. Para su estudio suele determinarse BIP como indicador de pro-supervivencia y CHOP como pro-apoptótico. Existen casos donde un nivel de estrés sub-lethal y crónico permite que la célula se adapte a la situación aumentando sustancialmente la expresión de chaperonas del RE y, luego de un pico en la expresión de CHOP, logra suprimirla. La naturaleza de la estabilidad de los ARNMs y proteínas implicados en las rutas que llevan a uno u otro destino celular, siendo los de las chaperonas más estables que los de los factores pro-apoptóticos, repercute en el desbalance de estas vías opuestas disparadas de manera simultánea (Rutkowski et al., 2006; Schönthal, 2012).

En biopsias duodenales de pacientes con EC activa observamos un estado de BIP incrementado y CHOP disminuido, patrón que asemejaría a un estado de adaptación al estrés. Para diferenciar si este fenómeno es a consecuencia de una composición más rica en células plasmáticas y/o porque otras células, principalmente enterocitos, están bajo estrés crónico (generado en el marco de la patología por incremento de ROS, aumento en la tasa de síntesis proteica ante la inflamación, etc.), es necesario puntualizar la expresión de los distintos elementos de la UPR en cada tipo celular. Extender nuestro estudio sobre biopsias de pacientes con enteropatías de grados intermedios ayudaría a esclarecer si en eventos tempranos del daño juega un rol o no la UPR en el disparo de apoptosis de enterocitos.

Es necesario resaltar en la complejidad de este entorno, que tanto el estrés de RE como el oxidativo inducen transglutaminasa 2 (TG2) (Luciani et al., 2010). Esta enzima está aumentada en EC activa y cumple un rol en la apoptosis tanto por vías dependientes como independientes de

caspasas, y también participa en la activación de la vía de NFκB (Bayardo et al., 2012; Yoo et al., 2012; Hoesel y Schmid, 2013). TG2, estrés de retículo y activación de NFκB, sumado a la participación de las especies reactivas del oxígeno, están directamente ligados y contribuyen a vías de inflamación y muerte celular que se solapan, dificultando la evaluación de su participación individual en el fenómeno observado en la pieza del tejido en la lesión crónica.

Conclusiones

- * No hemos evidenciado enterocitos diferenciados TUNEL⁺ en biopsias duodenales de pacientes con EC activa como tampoco en tejido sano.
- * En LP de intestino delgado de pacientes con EC activa observamos mayor número de células TUNEL⁺ y también de células en proliferación Ki67⁺; sugiriendo un estado activo de activación, proliferación y autolimitación.
- * No se observaron diferencias significativas en los niveles de proliferación celular en criptas entre celíacos y controles.
- * No evidenciamos un aumento de la actividad de la vía extrínseca de apoptosis. Los niveles de caspasa-8, FAS y FASL fueron similares en biopsia entera de pacientes celíacos y controles.
- * En la vía intrínseca, el cociente de BAX/BCL-2 determinado a nivel de ARNm se encontró a favor de un estado anti-apoptótico en biopsias de pacientes con EC activa.
- * Caspasa-3 presentó una tendencia a estar elevada en pacientes con EC activa; pero no se evidenciaron enterocitos caspasa-3⁺ por inmunofluorescencia. Tampoco fue posible detectar el fragmento de PARP1 correspondiente al clivaje por esta caspasa.
- * El fragmento de PARP1 compatible con clivaje por parte de granzimas se observó incrementado en mucosa duodenal de celíacos probablemente como reflejo de una mayor actividad de linfocitos T citotóxicos.
- * En el análisis del proceso de necroptosis, se observó que RIPK3 está levemente disminuido en biopsias duodenales de pacientes celíacos. RIPK3 se localizó principalmente en células de la cripta (probablemente células de Paneth), cuyo número puede verse reducido explicando los menores niveles de RIPK3 hallados en el tejido con enteropatía severa.

- * Caspasa-1 presentó una tendencia a niveles aumentados en mucosa duodenal con EC activa.
- * Se observó estrés de RE en mucosa duodenal en EC activa evidenciado por el incremento en la chaperona BIP. Las células que la expresan resultaron ser en su mayoría células plasmáticas CD138⁺ (tanto en controles como en celíacos). De manera diferencial, sólo en epitelio de pacientes con EC activa se observó la presencia de enterocitos BIP⁺.
- * La chaperona GRP94 presentó una tendencia a niveles aumentados de ARNm en mucosa EC activa, en concordancia con el punto anterior.
- * A nivel de ARNm, CHOP y EDEM1 se observaron significativamente disminuidos en EC y una tendencia similar siguió GADD34, probablemente consecuencia de la adaptación al estrés prolongado.
- * En base a las tendencias observadas, resumimos en la **Figura 67** los aspectos discutidos en este capítulo acerca de muerte celular y estrés de RE en EC.

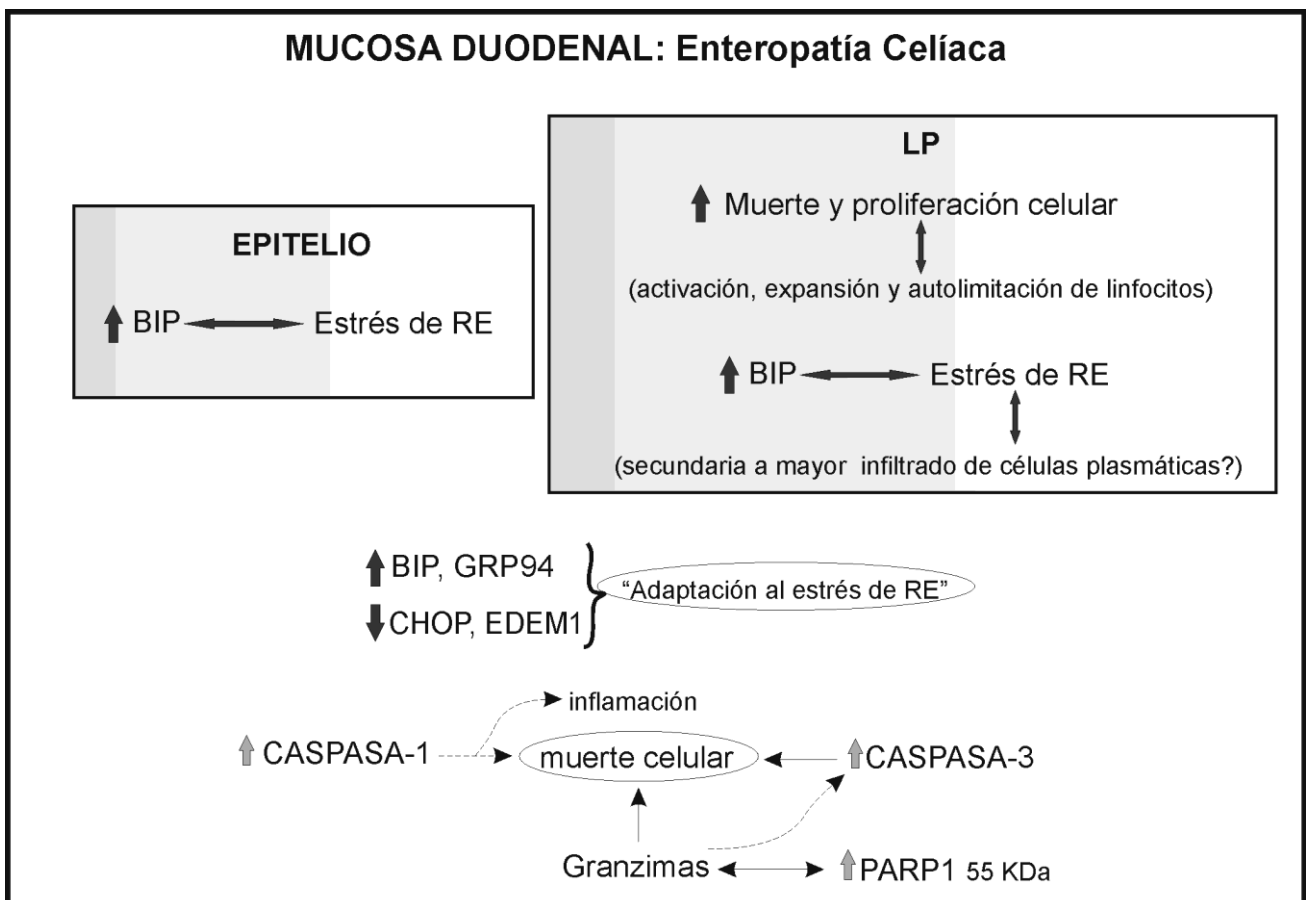


Figura 67. Estado de estrés de RE y muerte celular en EC.

Conclusiones Generales

En este trabajo hemos estudiado mediadores involucrados en diferentes etapas de la patogenia de la Enfermedad Celíaca utilizando distintos abordajes experimentales.

En primer lugar mostramos la evaluación de genes candidato de susceptibilidad. Los factores genéticos juegan un rol primordial en esta patología y su completa identificación puede ayudar tanto en el diagnóstico como en el conocimiento del mecanismo de la enfermedad. Implementando una estrategia de elección de genes candidato posicionales, hemos podido replicar los ensayos de asociación y demostrar asociación nominal en una población concreta para dos regiones. A raíz de esta señal, evidenciamos tres genes diferencialmente expresados en el tejido blanco de esta patología: *RUNX3*, *THEMIS* y *PTPRK*. Si bien no podríamos establecer una relación de causalidad, mostramos que la estrategia es válida para la identificación de genes implicados en el desarrollo y/o mantenimiento de la enteropatía.

Hemos demostrado además, la participación del eje quimiotáctico CXCR3/CXCL10 en el reclutamiento activo de células mediadoras de daño hacia la mucosa de pacientes con EC activa. Si bien es característica la presencia abundante de linfocitos T CD4⁺ y células plasmáticas en la *lamina propia*, así como el aumento del número de linfocitos intraepiteliales en la mucosa duodenal de pacientes con EC activa, no habían sido descriptos hasta el momento los mecanismos responsables de este reclutamiento selectivo. Si bien no descartamos la actividad de otros ejes en paralelo, nuestros resultados demuestran que el eje CXCR3/CXCL10 está involucrado en eventos disparadores de la enfermedad así como también en los procesos de reclutamiento celular que conllevan a la expansión y sostenimiento del proceso inflamatorio durante el curso de la patología. Además, nuestro trabajo sienta precedentes para la evaluación de la determinación sérica de CXCL10 como biomarcador en EC y la inhibición de esta quimoquina como una posible estrategia terapéutica.

Finalmente, hemos abordado el análisis de la expresión de moléculas asociadas a estrés de retículo y a vías de muerte celular. Esto es relevante dada la importancia de estas rutas en el establecimiento de la enteropatía. Este trabajo constituye una primera evaluación del estado general de estas vías en la mucosa duodenal durante la enteropatía avanzada. Nuestros resultados evidencian un epitelio intestinal con un marcado estrés de retículo, aunque no hemos podido identificar rutas de muerte celular activas asociadas a este proceso. En este sentido, dado que la muestra de biopsia duodenal es compleja en composición celular y con un grado de enteropatía

muy avanzada y variable, resulta difícil arribar a resultados concluyentes sobre el rol de una vía definida. Sin embargo nuestras observaciones sugieren que distintas vías de muerte, y no sólo la apoptótica extrínseca como había sido extensamente propuesto, podrían participar activamente en los mecanismos de daño en la mucosa intestinal en EC activa.

Bibliografía

- Abadie, V., Discepolo, V., Jabri, B., 2012. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 34, 551–566. doi:10.1007/s00281-012-0316-x
- Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., Jabri, B., 2011. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 493–525. doi:10.1146/annurev-immunol-040210-092915
- Alarcón-Riquelme, M.E., 2004. Role of RUNX in autoimmune diseases linking rheumatoid arthritis, psoriasis and lupus. *Arthritis Res. Ther.* 6, 169–173. doi:10.1186/ar1203
- Amundsen, S.S., Viken, M.K., Sollid, L.M., Lie, B.A., 2014. Coeliac disease-associated polymorphisms influence thymic gene expression. *Genes Immun.* 15, 355–360. doi:10.1038/gene.2014.26
- Anders, L., Mertins, P., Lammich, S., Murgia, M., Hartmann, D., Saftig, P., Haass, C., Ullrich, A., 2006. Furin-, ADAM 10-, and gamma-secretase-mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of beta-catenin's transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3917–3934. doi:10.1128/MCB.26.10.3917-3934.2006
- Antonelli, A., Fallahi, P., Ferrari, S.M., Pupilli, C., d' Annunzio, G., Lorini, R., Vanelli, M., Ferrannini, E., 2008. Serum Th1 (CXCL10) and Th2 (CCL2) chemokine levels in children with newly diagnosed Type 1 diabetes: a longitudinal study. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 25, 1349–1353. doi:10.1111/j.1464-5491.2008.02577.x
- Barone, M.V., Gimigliano, A., Castoria, G., Paoletta, G., Maurano, F., Paparo, F., Maglio, M., Mineo, A., Miele, E., Nanayakkara, M., Troncone, R., Auricchio, S., 2007. Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut* 56, 480–488. doi:10.1136/gut.2005.086637
- Barone, M.V., Zanzi, D., Maglio, M., Nanayakkara, M., Santagata, S., Lania, G., Miele, E., Ribecco, M.T.S., Maurano, F., Auricchio, R., Gianfrani, C., Ferrini, S., Troncone, R., Auricchio, S., 2011. Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One* 6, e17039. doi:10.1371/journal.pone.0017039
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457
- Bayardo, M., Punzi, F., Bondar, C., Chopita, N., Chirido, F., 2012. Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- γ and tumour necrosis factor- α in human small intestine. *Clin. Exp. Immunol.* 168, 95–104. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04545.x
- Benahmed, M., Meresse, B., Arnulf, B., Barbe, U., Mention, J.-J., Verkarre, V., Allez, M., Cellier, C., Hermine, O., Cerf-Bensussan, N., 2007. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology* 132, 994–1008. doi:10.1053/j.gastro.2006.12.025
- Bogaert, S., De Vos, M., Olievier, K., Peeters, H., Elewaut, D., Lambrecht, B., Pouliot, P., Laukens, D., 2011. Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease? *PLoS One* 6, e25589. doi:10.1371/journal.pone.0025589
- Brenner, O., Levanon, D., Negreanu, V., Golubkov, O., Fainaru, O., Woolf, E., Groner, Y., 2004. Loss of Runx3 function in leukocytes is associated with spontaneously developed colitis and gastric mucosal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16016–16021. doi:10.1073/pnas.0407180101
- Brockmeyer, C., Paster, W., Pepper, D., Tan, C.P., Trudgian, D.C., McGowan, S., Fu, G., Gascoigne, N.R.J., Acuto, O., Salek, M., 2011. T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J. Biol. Chem.* 286, 7535–7547. doi:10.1074/jbc.M110.201236
- Brucklacher-Waldert, V., Carr, E.J., Linterman, M.A., Veldhoen, M., 2014. Cellular Plasticity of CD4+ T Cells in the Intestine. *Front. Immunol.* 5, 488. doi:10.3389/fimmu.2014.00488
- Cakir, M., Levendoglu, F., Kiyici, A., Coskun, Y., 2011. Serum CXCL10 levels and neuromuscular manifestations in patients with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 44, 496–503. doi:10.3109/08916934.2011.561818
- Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C., Kroemer, G., 2004. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* 11, 591–595. doi:10.1038/sj.cdd.4401400
- Caputo, I., Secondo, A., Lepretti, M., Paoletta, G., Auricchio, S., Barone, M.V., Esposito, C., 2012. Gliadin Peptides Induce Tissue Transglutaminase Activation and ER-Stress through Ca²⁺ Mobilization in Caco-2 Cells. *PLoS ONE* 7, e45209. doi:10.1371/journal.pone.0045209

- Chaitanya, G.V., Steven, A.J., Babu, P.P., 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal. CCS* 8, 31. doi:10.1186/1478-811X-8-31
- Christen, U., McGavern, D.B., Luster, A.D., von Herrath, M.G., Oldstone, M.B.A., 2003. Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 6838–6845.
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., Corazza, G.R., 2005. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 408–416. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02783.x
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., Parroni, R., D'alò, S., Pistoia, M.A., Doglioni, C., Cifone, M.G., Corazza, G.R., 2000. Cytolytic mechanisms of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease (CoD). *Clin. Exp. Immunol.* 120, 235–240.
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- Conde, L., Vaquerizas, J.M., Dopazo, H., Arbiza, L., Reumers, J., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Dopazo, J., 2006. PupaSuite: finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes. *Nucleic Acids Res.* 34, W621–625. doi:10.1093/nar/gkl071
- Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y., Rao, A., 2009. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* 206, 51–59. doi:10.1084/jem.20081242
- Denes, A., Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2012. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis.* 3, e338. doi:10.1038/cddis.2012.86
- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Cupelli, F., Cinque, B., Millimaggi, D., Clarkson, M.M., Paulli, M., Cifone, M.G., Corazza, G.R., 2006. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* 55, 469–477. doi:10.1136/gut.2005.068684
- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., D'Alò, S., Parroni, R., Millimaggi, D., Cifone, M.G., Corazza, G.R., 2001. Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut* 49, 380–386.
- Di Sabatino, A., Miceli, E., Dhaliwal, W., Biancheri, P., Salerno, R., Cantoro, L., Vanoli, A., De Vincenzi, M., Blanco, C.D.V., MacDonald, T.T., Corazza, G.R., 2008. Distribution, proliferation, and function of Paneth cells in uncomplicated and complicated adult celiac disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 130, 34–42. doi:10.1309/5ADNAR4VN11TTKQ6
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., Ansel, K.M., 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Irfng and silence Ii4 in T helper type 1 cells. *Nat. Immunol.* 8, 145–153. doi:10.1038/ni1424
- Drut, R., Rúa, E.C., 2001. The histopathology of pediatric celiac disease: order must prevail out of chaos. *Int. J. Surg. Pathol.* 9, 261–264.
- Dubois, P.C.A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G.A.R., Adány, R., Aromaa, A., Bardella, M.T., van den Berg, L.H., Bockett, N.A., de la Concha, E.G., Dema, B., Fehrmann, R.S.N., Fernández-Arquero, M., Fiatal, S., Grandone, E., Green, P.M., Groen, H.J.M., Gwilliam, R., Houwen, R.H.J., Hunt, S.E., Kaukinen, K., Kelleher, D., Korponay-Szabo, I., Kurppa, K., MacMathuna, P., Mäki, M., Mazzilli, M.C., McCann, O.T., Mearin, M.L., Mein, C.A., Mirza, M.M., Mistry, V., Mora, B., Morley, K.I., Mulder, C.J., Murray, J.A., Núñez, C., Oosterom, E., Ophoff, R.A., Polanco, I., Peltonen, L., Platteel, M., Rybak, A., Salomaa, V., Schweizer, J.J., Sperandeo, M.P., Tack, G.J., Turner, G., Veldink, J.H., Verbeek, W.H.M., Weersma, R.K., Wolters, V.M., Urcelay, E., Cukrowska, B., Greco, L., Neuhausen, S.L., McManus, R., Barisani, D., Deloukas, P., Barrett, J.C., Saavalainen, P., Wijmenga, C., van Heel, D.A., 2010. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat. Genet.* 42, 295–302. doi:10.1038/ng.543
- Dunne, M.R., Elliott, L., Hussey, S., Mahmud, N., Kelly, J., Doherty, D.G., Feighery, C.F., 2013. Persistent changes in circulating and intestinal $\gamma\delta$ T cell subsets, invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in children and adults with coeliac disease. *PLoS One* 8, e76008. doi:10.1371/journal.pone.0076008
- Dwinell, M.B., Lügering, N., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., 2001. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120, 49–59.

- Ebert, L.M., Schaerli, P., Moser, B., 2005. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol.* 42, 799–809. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.040
- Ehlert, J.E., Addison, C.A., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., 2004. Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 6234–6240.
- Ewen, C.L., Kane, K.P., Bleackley, R.C., 2012. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ.* 19, 28–35. doi:10.1038/cdd.2011.153
- Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Flynn, E., Martin, P., Wilson, A.G., Morgan, A.W., Emery, P., Steer, S., Hocking, L.J., Reid, D.M., Harrison, P., Wordsworth, P., Yorkshire Early Arthritis Consortium, Biologics in RA Control Consortium, Thomson, W., Worthington, J., Barton, A., 2010. Overlapping genetic susceptibility variants between three autoimmune disorders: rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and coeliac disease. *Arthritis Res. Ther.* 12, R175. doi:10.1186/ar3139
- Farin, H.F., Karthaus, W.R., Kujala, P., Rakhshandehroo, M., Schwank, G., Vries, R.G.J., Kalkhoven, E., Nieuwenhuis, E.E.S., Clevers, H., 2014. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN- γ . *J. Exp. Med.* 211, 1393–1405. doi:10.1084/jem.20130753
- Fasano, A., Not, T., Wang, W., Uzzau, S., Berti, I., Tommasini, A., Goldblum, S.E., 2000. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 355, 1518–1519. doi:10.1016/S0140-6736(00)02169-3
- Fasano, A., Sapone, A., Zevallos, V., Schuppan, D., n.d. Non-celiac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2014.12.049
- Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97, 14–32.
- Feng, S., Yang, Y., Mei, Y., Ma, L., Zhu, D., Hoti, N., Castanares, M., Wu, M., 2007. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell. Signal.* 19, 2056–2067. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.016
- Fu, G., Vallée, S., Rybakina, V., McGuire, M.V., Ampudia, J., Brockmeyer, C., Salek, M., Fallen, P.R., Hoerter, J.A.H., Munshi, A., Huang, Y.H., Hu, J., Fox, H.S., Sauer, K., Acuto, O., Gascoigne, N.R.J., 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* 10, 848–856. doi:10.1038/ni.1766
- Giampietri, C., Starace, D., Petrunaro, S., Filippini, A., Ziparo, E., 2014. Necroptosis: molecular signalling and translational implications. *Int. J. Cell Biol.* 2014, 490275. doi:10.1155/2014/490275
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30, 503–512.
- Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Varí, R., D'Archivio, M., Straface, E., Masella, R., Malorni, W., De Vincenzi, M., 2003. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett.* 540, 117–124.
- Gomez, J.C., Selvaggio, G.S., Viola, M., Pizarro, B., la Motta, G., de Barrio, S., Castelletto, R., Echeverría, R., Sugai, E., Vazquez, H., Mauriño, E., Bai, J.C., 2001. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 2700–2704. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.04124.x
- Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., Ley, K., 2009. Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med.* 9, 836–850.
- Groom, J.R., Luster, A.D., 2011a. CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.* 317, 620–631. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.017
- Groom, J.R., Luster, A.D., 2011b. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* 89, 207–215. doi:10.1038/icb.2010.158
- Grueter, B., Petter, M., Egawa, T., Laule-Kilian, K., Aldrian, C.J., Wuerch, A., Ludwig, Y., Fukuyama, H., Wardemann, H., Waldschuetz, R., Möröy, T., Taniuchi, I., Steimle, V., Littman, D.R., Ehlers, M., 2005. Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 1694–1705.

- Gülow, K., Bienert, D., Haas, I.G., 2002. BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency. *J. Cell Sci.* 115, 2443–2452.
- Günther, C., Buchen, B., He, G.-W., Hornef, M., Torow, N., Neumann, H., Wittkopf, N., Martini, E., Basic, M., Bleich, A., Watson, A.J.M., Neurath, M.F., Becker, C., 2014. Caspase-8 controls the gut response to microbial challenges by Tnf- α -dependent and independent pathways. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2014-307226
- Günther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M.J., Hedrick, S.M., Tenzer, S., Neurath, M.F., Becker, C., 2011. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* 477, 335–339. doi:10.1038/nature10400
- Gutzeit, C., Magri, G., Cerutti, A., 2014. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol. Rev.* 260, 76–85. doi:10.1111/immr.12189
- Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 89–102. doi:10.1038/nrm3270
- Heyman, M., Abed, J., Lebreton, C., Cerf-Bensussan, N., 2012. Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut* 61, 1355–1364. doi:10.1136/gutjnl-2011-300327
- Hoesel, B., Schmid, J.A., 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86. doi:10.1186/1476-4598-12-86
- Hosomi, S., Oshitani, N., Kamata, N., Sogawa, M., Okazaki, H., Tanigawa, T., Yamagami, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Maeda, K., Hirakawa, K., Arakawa, T., 2011. Increased numbers of immature plasma cells in peripheral blood specifically overexpress chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 in patients with ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 163, 215–224. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04290.x
- Howell, W.M., 2014. HLA and disease: guilt by association. *Int. J. Immunogenet.* 41, 1–12. doi:10.1111/iji.12088
- Hüe, S., Mention, J.-J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., Caillat-Zucman, S., 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21, 367–377. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.018
- Husby, S., Murray, J.A., 2014. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 655–663. doi:10.1038/nrgastro.2014.162
- Ianiro, G., Gasbarrini, A., Cammarota, G., 2013. Endoscopic tools for the diagnosis and evaluation of celiac disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 8562–8570. doi:10.3748/wjg.v19.i46.8562
- International HapMap Consortium, 2003. The International HapMap Project. *Nature* 426, 789–796. doi:10.1038/nature02168
- Iwata, R., Sasaki, N., Agui, T., 2010. Contiguous gene deletion of Ptpkr and Themis causes T-helper immunodeficiency (thid) in the LEC rat. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 31, 83–87.
- Jabri, B., Sollid, L.M., 2009. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 858–870. doi:10.1038/nri2670
- Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W., 2007. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol. Rev.* 215, 226–242. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00482.x
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38, 209–223. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.003
- Kaser, A., Blumberg, R.S., 2009. Endoplasmic reticulum stress in the intestinal epithelium and inflammatory bowel disease. *Semin. Immunol.* 21, 156–163. doi:10.1016/j.smim.2009.01.001
- Kaser, A., Flak, M.B., Tomczak, M.F., Blumberg, R.S., 2011. The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation. *Exp. Cell Res.* 317, 2772–2779. doi:10.1016/j.yexcr.2011.07.008
- Keuning, J.J., Peña, A.S., van Leeuwen, A., van Hooff, J.P., van Rood, J.J., 1976. HLA-DW3 associated with coeliac disease. *Lancet* 1, 506–508.

- Klöck, C., Diraimondo, T.R., Khosla, C., 2012. Role of transglutaminase 2 in celiac disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.* 34, 513–522. doi:10.1007/s00281-012-0305-0
- Knoop, K.A., Miller, M.J., Newberry, R.D., 2013. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29, 112–118. doi:10.1097/MOG.0b013e32835cf1cd
- Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W.F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M., Satake, M., 2009. The Runx3 transcription factor augments Th1 and down-modulates Th2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 7817–7824. doi:10.4049/jimmunol.0802527
- Korniejewska, A., McKnight, A.J., Johnson, Z., Watson, M.L., Ward, S.G., 2011. Expression and agonist responsiveness of CXCR3 variants in human T lymphocytes. *Immunology* 132, 503–515. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03384.x
- Kumar, V., Wijmenga, C., Withoff, S., 2012. From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Semin. Immunopathol.* 34, 567–580. doi:10.1007/s00281-012-0312-1
- Lacotte, S., Brun, S., Muller, S., Dumortier, H., 2009. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173, 310–317. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04813.x
- Lammers, K.M., Lu, R., Brownley, J., Lu, B., Gerard, C., Thomas, K., Rallabhandi, P., Shea-Donohue, T., Tamiz, A., Alkan, S., Netzel-Arnett, S., Antalis, T., Vogel, S.N., Fasano, A., 2008. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135, 194–204.e3. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.023
- Laragione, T., Brenner, M., Sherry, B., Gulko, P.S., 2011. CXCL10 and its receptor CXCR3 regulate synovial fibroblast invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 3274–3283. doi:10.1002/art.30573
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., Marra, F., Romagnani, S., Serio, M., Romagnani, P., 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* 197, 1537–1549. doi:10.1084/jem.20021897
- Lee, C.W.L., Ito, K., Ito, Y., 2010. Role of RUNX3 in bone morphogenetic protein signaling in colorectal cancer. *Cancer Res.* 70, 4243–4252. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3805
- Lee, E.Y., Lee, Z.-H., Song, Y.W., 2009. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 8, 379–383. doi:10.1016/j.autrev.2008.12.002
- Lee, E.Y., Lee, Z.H., Song, Y.W., 2013. The interaction between CXCL10 and cytokines in chronic inflammatory arthritis. *Autoimmun. Rev.* 12, 554–557. doi:10.1016/j.autrev.2012.10.001
- Lesourne, R., Uehara, S., Lee, J., Song, K.-D., Li, L., Pinkhasov, J., Zhang, Y., Weng, N.-P., Wildt, K.F., Wang, L., Bosselut, R., Love, P.E., 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* 10, 840–847. doi:10.1038/ni.1768
- Levanon, D., Bernstein, Y., Negreanu, V., Bone, K.R., Pozner, A., Eilam, R., Lotem, J., Brenner, O., Groner, Y., 2011. Absence of Runx3 expression in normal gastrointestinal epithelium calls into question its tumour suppressor function. *EMBO Mol. Med.* 3, 593–604. doi:10.1002/emmm.201100168
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J.M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N.O., Stiles, J.K., 2011. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 121–130. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.06.001
- Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., Chen, Z., 2014. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* doi:10.1093/abbs/gmu048
- Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S.A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B., 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184, 963–969.
- Long, J.S., Ryan, K.M., 2012. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 31, 5045–5060. doi:10.1038/onc.2012.7

- Luciani, A., Vilella, V.R., Vasaturo, A., Giardino, I., Pettoello-Mantovani, M., Guido, S., Cexus, O.N., Peake, N., Londei, M., Quarantino, S., Maiuri, L., 2010. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR γ downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* 59, 311–319. doi:10.1136/gut.2009.183608
- Ludvigsson, J.F., Bai, J.C., Biagi, F., Card, T.R., Ciacci, C., Ciclitira, P.J., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Holdoway, A., van Heel, D.A., Kaukinen, K., Leffler, D.A., Leonard, J.N., Lundin, K.E.A., McGough, N., Davidson, M., Murray, J.A., Swift, G.L., Walker, M.M., Zingone, F., Sanders, D.S., BSG Coeliac Disease Guidelines Development Group, British Society of Gastroenterology, 2014. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* 63, 1210–1228. doi:10.1136/gutjnl-2013-306578
- Ludvigsson, J.F., Leffler, D.A., Bai, J.C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C.P., Leonard, J.N., Lundin, K.E.A., Murray, J.A., Sanders, D.S., Walker, M.M., Zingone, F., Ciacci, C., 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 62, 43–52. doi:10.1136/gutjnl-2011-301346
- Maiuri, L., Ciacci, C., Raia, V., Vacca, L., Ricciardelli, I., Raimondi, F., Auricchio, S., Quarantino, S., Londei, M., 2001. FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut* 48, 418–424.
- Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quarantino, S., Londei, M., 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362, 30–37. doi:10.1016/S0140-6736(03)13803-2
- Malamut, G., Meresse, B., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., 2012. Refractory celiac disease: from bench to bedside. *Semin. Immunopathol.* 34, 601–613. doi:10.1007/s00281-012-0322-z
- Marsh, M.N., 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102, 330–354.
- Marzec, M., Eletto, D., Argon, Y., 2012. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 774–787. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.10.013
- Matsuoka, Y., Tsujimoto, Y., 2015. Role of RIP1 in physiological enterocyte turnover in mouse small intestine via nonapoptotic death. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 20, 11–28. doi:10.1111/gtc.12193
- Matysiak-Budnik, T., Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Ménard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., van Niel, G., Bouhnik, Y., Lamarque, D., Chaussade, S., Malamut, G., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Monteiro, R.C., Heyman, M., 2008. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J. Exp. Med.* 205, 143–154. doi:10.1084/jem.20071204
- Maynard, C.L., Weaver, C.T., 2009. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 31, 389–400. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.012
- Ma, Y., Shimizu, Y., Mann, M.J., Jin, Y., Hendershot, L.M., 2010. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones* 15, 281–293. doi:10.1007/s12192-009-0142-9
- Mazzarella, G., Stefanile, R., Camarca, A., Giliberti, P., Cosentini, E., Marano, C., Iaquinto, G., Giardullo, N., Auricchio, S., Sette, A., Troncone, R., Gianfrani, C., 2008. Gliadin activates HLA class I-restricted CD8⁺ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis. *Gastroenterology* 134, 1017–1027. doi:10.1053/j.gastro.2008.01.008
- Meiser, A., Mueller, A., Wise, E.L., McDonagh, E.M., Petit, S.J., Saran, N., Clark, P.C., Williams, T.J., Pease, J.E., 2008. The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 6713–6724.
- Mention, J.-J., Ben Ahmed, M., Bègue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J.-F., Cugnenc, P.-H., Ruemmele, F.M., McIntyre, E., Brousse, N., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., 2003. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125, 730–745.
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., Green, P.H., Jabri, B., 2004. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21, 357–366. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.020

- Meresse, B., Malamut, G., Cerf-Bensussan, N., 2012. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity* 36, 907–919. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.006
- Molberg, O., Uhlen, A.K., Jensen, T., Flaete, N.S., Fleckenstein, B., Arentz-Hansen, H., Raki, M., Lundin, K.E.A., Sollid, L.M., 2005. Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: implications for celiac disease. *Gastroenterology* 128, 393–401.
- Montalvillo, E., Garrote, J.A., Bernardo, D., Arranz, E., 2014. Innate lymphoid cells and natural killer T cells in the gastrointestinal tract immune system. *Rev. Esp. Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Esp. Patol. Dig.* 106, 334–345.
- Mora, M., Litwin, N., Toca, M. del C., Azcona, M.I., Solís Neffa, R., Battiston, F., Solaegui, M., Ortiz, G., Wagener, M., Olivera, J., Marchisone, S., Oropeza, G., Bastianelli, C., González, A., Rezzónico, G., 2012. Prevalence of celiac disease: multicentric trial among pediatric population from five urban districts in Argentina. *Arch. Argent. Pediatría* 110, 490–496. doi:10.1590/S0325-00752012000600006
- Moriwaki, K., Chan, F.K.-M., 2013. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev.* 27, 1640–1649. doi:10.1101/gad.223321.113
- Mowat, A.M., Agace, W.W., 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685. doi:10.1038/nri3738
- Müller, M., Carter, S., Hofer, M.J., Campbell, I.L., 2010. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity—a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 36, 368–387. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01089.x
- Murray, J.A., Rubio-Tapia, A., Van Dyke, C.T., Brogan, D.L., Knipschild, M.A., Lahr, B., Rumalla, A., Zinsmeister, A.R., Gostout, C.J., 2008. Mucosal atrophy in celiac disease: extent of involvement, correlation with clinical presentation, and response to treatment. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 6, 186–193; quiz 125. doi:10.1016/j.cgh.2007.10.012
- Nanayakkara, M., Lania, G., Maglio, M., Discepolo, V., Sarno, M., Gaito, A., Troncone, R., Auricchio, S., Auricchio, R., Barone, M.V., 2013a. An undigested gliadin peptide activates innate immunity and proliferative signaling in enterocytes: the role in celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 98, 1123–1135. doi:10.3945/ajcn.112.054544
- Nanayakkara, M., Lania, G., Maglio, M., Kosova, R., Sarno, M., Gaito, A., Discepolo, V., Troncone, R., Auricchio, S., Auricchio, R., Barone, M.V., 2013b. Enterocyte proliferation and signaling are constitutively altered in celiac disease. *PLoS One* 8, e76006. doi:10.1371/journal.pone.0076006
- Nica, A.C., Dermitzakis, E.T., 2013. Expression quantitative trait loci: present and future. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20120362. doi:10.1098/rstb.2012.0362
- Nicoletti, F., Conget, I., Di Mauro, M., Di Marco, R., Mazzarino, M.C., Bendtzen, K., Messina, A., Gomis, R., 2002. Serum concentrations of the interferon-gamma-inducible chemokine IP-10/CXCL10 are augmented in both newly diagnosed Type I diabetes mellitus patients and subjects at risk of developing the disease. *Diabetologia* 45, 1107–1110. doi:10.1007/s00125-002-0879-5
- Oberhuber, G., Granditsch, G., Vogelsang, H., 1999. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1185–1194.
- Oh, S., Perera, L.P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T.A., Berzofsky, J.A., 2008. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5201–5206. doi:10.1073/pnas.0801003105
- Oliva, L., Cenci, S., 2014. Autophagy in plasma cell pathophysiology. *Front. Immunol.* 5, 103. doi:10.3389/fimmu.2014.00103
- Olson, T.S., Ley, K., 2002. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R7–28. doi:10.1152/ajpregu.00738.2001
- Ostvik, A.E., Granlund, A.V.B., Bugge, M., Nilsen, N.J., Torp, S.H., Waldum, H.L., Damås, J.K., Espvik, T., Sandvik, A.K., 2013. Enhanced expression of CXCL10 in inflammatory bowel disease: potential role of mucosal Toll-like receptor 3 stimulation. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 265–274. doi:10.1002/ibd.23034

- Pabst, O., Mowat, A.M., 2012. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 5, 232–239. doi:10.1038/mi.2012.4
- Palová-Jelínková, L., Dáňová, K., Drašarová, H., Dvořák, M., Funda, D.P., Fundová, P., Kotrbová-Kozak, A., Černá, M., Kamanová, J., Martin, S.F., Freudenberg, M., Tučková, L., 2013. Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1 β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- κ B Signaling Pathway and an NLRP3 Inflammasome Activation. *PLoS ONE* 8, e62426. doi:10.1371/journal.pone.0062426
- Peng, Z., Wei, D., Wang, L., Tang, H., Zhang, J., Le, X., Jia, Z., Li, Q., Xie, K., 2006. RUNX3 inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and reduces the angiogenesis, growth, and metastasis of human gastric cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 6386–6394. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2359
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153. doi:10.1038/nri3608
- Poggi, A., Zancolli, M., Catellani, S., Borsellino, G., Battistini, L., Zocchi, M.R., 2007. Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands: adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1107, 68–78. doi:10.1196/annals.1381.008
- Proudfoot, A.E.I., 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 106–115. doi:10.1038/nri722
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575. doi:10.1086/519795
- Qiao, S.-W., Iversen, R., Ráki, M., Sollid, L.M., 2012. The adaptive immune response in celiac disease. *Semin. Immunopathol.* 34, 523–540. doi:10.1007/s00281-012-0314-z
- Rabquer, B.J., Tsou, P.-S., Hou, Y., Thirunavukkarasu, E., Haines, G.K., 3rd, Impens, A.J., Phillips, K., Kahaleh, B., Seibold, J.R., Koch, A.E., 2011. Dysregulated expression of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and CXCL16 and their receptors in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* 13, R18. doi:10.1186/ar3242
- Randall, T.D., Mebius, R.E., 2014. The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with microorganisms. *Mucosal Immunol.* 7, 455–466. doi:10.1038/mi.2014.11
- Ravelli, A., Villanacci, V., Monfredini, C., Martinazzi, S., Grassi, V., Manenti, S., 2010. How patchy is patchy villous atrophy?: distribution pattern of histological lesions in the duodenum of children with celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2103–2110. doi:10.1038/ajg.2010.153
- Rhode, A., Pauza, M.E., Barral, A.M., Rodrigo, E., Oldstone, M.B.A., von Herrath, M.G., Christen, U., 2005. Islet-specific expression of CXCL10 causes spontaneous islet infiltration and accelerates diabetes development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 3516–3524.
- Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., Kaufman, R.J., 2006. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* 4, e374. doi:10.1371/journal.pbio.0040374
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Mackay, C.R., 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* 19, 568–574.
- Salvati, V.M., MacDonald, T.T., Bajaj-Elliott, M., Borrelli, M., Staiano, A., Auricchio, S., Troncone, R., Monteleone, G., 2002. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* 50, 186–190. doi:10.1136/gut.50.2.186
- Sano, R., Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3460–3470. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028
- Sap, J., Jiang, Y.P., Friedlander, D., Grumet, M., Schlessinger, J., 1994. Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1–9.
- Schnekenburger, J., Mayerle, J., Krüger, B., Buchwalow, I., Weiss, F.U., Albrecht, E., Samoilova, V.E., Domschke, W., Lerch, M.M., 2005. Protein tyrosine phosphatase kappa and SHP-1 are involved in the regulation of cell-cell contacts at adherens junctions in the exocrine pancreas. *Gut* 54, 1445–1455. doi:10.1136/gut.2004.063164

- Schönthal, A.H., 2012. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica* 2012, 857516. doi:10.6064/2012/857516
- Schroepf, S., Kappler, R., Brand, S., Prell, C., Lohse, P., Glas, J., Hoster, E., Helmbrecht, J., Ballauff, A., Berger, M., von Schweinitz, D., Koletzko, S., Lacher, M., 2010. Strong overexpression of CXCR3 axis components in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1882–1890. doi:10.1002/ibd.21312
- Schulz, O., Pabst, O., 2013. Antigen sampling in the small intestine. *Trends Immunol.* 34, 155–161. doi:10.1016/j.it.2012.09.006
- Senapati, S., Gutierrez-Achury, J., Sood, A., Midha, V., Szperl, A., Romanos, J., Zhernakova, A., Franke, L., Alonso, S., Thelma, B.K., Wijmenga, C., Trynka, G., 2014. Evaluation of European coeliac disease risk variants in a north Indian population. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* doi:10.1038/ejhg.2014.137
- Shale, M., Schiering, C., Powrie, F., 2013. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* 252, 164–182. doi:10.1111/imr.12039
- Shalimar, D.M., Das, P., Sreenivas, V., Gupta, S.D., Panda, S.K., Makharia, G.K., 2013. Mechanism of villous atrophy in celiac disease: role of apoptosis and epithelial regeneration. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137, 1262–1269. doi:10.5858/arpa.2012-0354-OA
- Shibahara, T., Wilcox, J.N., Couse, T., Madara, J.L., 2001. Characterization of epithelial chemoattractants for human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120, 60–70.
- Singh, A.K., Arya, R.K., Trivedi, A.K., Sanyal, S., Baral, R., Dormond, O., Briscoe, D.M., Datta, D., 2013. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 41–49. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.08.007
- Sollid, L.M., 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 647–655. doi:10.1038/nri885
- Sollid, L.M., Jabri, B., 2013. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 294–302. doi:10.1038/nri3407
- Sollid, L.M., Thorsby, E., 1993. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 105, 910–922.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E., 2013. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149. doi:10.1038/nri3365
- Steen, A., Larsen, O., Thiele, S., Rosenkilde, M.M., 2014. Biased and G protein-independent signaling of chemokine receptors. *Front. Immunol.* 5, 277. doi:10.3389/fimmu.2014.00277
- Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190. doi:10.1038/ncb0311-184
- Todd, D.J., Lee, A.-H., Glimcher, L.H., 2008. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 663–674. doi:10.1038/nri2359
- Tong, D.-D., Jiang, Y., Li, M., Kong, D., Meng, X.-N., Zhao, Y.-Z., Jin, Y., Bai, J., Fu, S.-B., Geng, J.-S., 2009. RUNX3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by TGF-beta-dependent and -independent mechanisms in human colon carcinoma cells. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* 76, 163–169. doi:10.1159/000218332
- Tonutti, E., Bizzaro, N., 2014. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmun. Rev., Diagnostic criteria in Autoimmune diseases 9th International Congress on Autoimmunity* 13, 472–476. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.043
- Trynka, G., Hunt, K.A., Bockett, N.A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S.F., Bardella, M.T., Bhaw-Rosun, L., Castillejo, G., de la Concha, E.G., de Almeida, R.C., Dias, K.-R.M., van Diemen, C.C., Dubois, P.C.A., Duerr, R.H., Edkins, S., Franke, L., Fransen, K., Gutierrez, J., Heap, G.A.R., Hrdlickova, B., Hunt, S., Plaza Izurieta, L., Izzo, V., Joosten, L.A.B., Langford, C., Mazzilli, M.C., Mein, C.A., Midha, V., Mitrovic, M., Mora, B., Morelli, M., Nutland, S., Núñez, C., Onengut-Gumuscu, S., Pearce, K., Platteel, M., Polanco, I., Potter, S., Ribes-Koninckx, C., Ricaño-Ponce, I., Rich, S.S., Rybak, A., Santiago, J.L., Senapati, S., Sood, A., Szajewska, H., Troncone, R.,

- Varadé, J., Wallace, C., Wolters, V.M., Zhernakova, A., Spanish Consortium on the Genetics of Coeliac Disease (CEGEC), PreventCD Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), Thelma, B.K., Cukrowska, B., Urcelay, E., Bilbao, J.R., Mearin, M.L., Barisani, D., Barrett, J.C., Plagnol, V., Deloukas, P., Wijmenga, C., van Heel, D.A., 2011. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat. Genet.* 43, 1193–1201. doi:10.1038/ng.998
- Trynka, G., Wijmenga, C., van Heel, D.A., 2010. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol. Med.* 16, 537–550. doi:10.1016/j.molmed.2010.09.003
- Vandercappellen, J., Van Damme, J., Struyf, S., 2011. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 1–18. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.011
- Van Heel, D.A., Franke, L., Hunt, K.A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., Wapenaar, M.C., Barnardo, M.C.N.M., Bethel, G., Holmes, G.K.T., Feighery, C., Jewell, D., Kelleher, D., Kumar, P., Travis, S., Walters, J.R.F., Sanders, D.S., Howdle, P., Swift, J., Playford, R.J., McLaren, W.M., Mearin, M.L., Mulder, C.J., McManus, R., McGinnis, R., Cardon, L.R., Deloukas, P., Wijmenga, C., 2007. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat. Genet.* 39, 827–829. doi:10.1038/ng2058
- Van Raemdonck, K., Van den Steen, P.E., Liekens, S., Van Damme, J., Struyf, S., 2014. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* doi:10.1016/j.cytogfr.2014.11.009
- Villablanca, E.J., Cassani, B., von Andrian, U.H., Mora, J.R., 2011. Blocking lymphocyte localization to the gastrointestinal mucosa as a therapeutic strategy for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1776–1784. doi:10.1053/j.gastro.2011.02.015
- Villanacci, V., Ceppa, P., Tavani, E., Vindigni, C., Volta, U., Gruppo Italiano Patologi Apparato Digerente (GIPAD), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology, Italian division (SIAPEC/IAP), 2011. Coeliac disease: the histology report. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 43 Suppl 4, S385–395. doi:10.1016/S1590-8658(11)60594-X
- Wang, X., Jiang, W., Yan, Y., Gong, T., Han, J., Tian, Z., Zhou, R., 2014. RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway. *Nat. Immunol.* doi:10.1038/ni.3015
- Ward, L.D., Kellis, M., 2012. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* 40, D930–934. doi:10.1093/nar/gkr917
- Watanabe, K., Sugai, M., Nambu, Y., Osato, M., Hayashi, T., Kawaguchi, M., Komori, T., Ito, Y., Shimizu, A., 2010. Requirement for Runx proteins in IgA class switching acting downstream of TGF-beta 1 and retinoic acid signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 2785–2792. doi:10.4049/jimmunol.0901823
- Weersma, R.K., Zhou, L., Nolte, I.M., van der Steege, G., van Dullemen, H.M., Oosterom, E., Bok, L., Peppelenbosch, M.P., Faber, K.N., Kleibeuker, J.H., Dijkstra, G., 2008. Runt-related transcription factor 3 is associated with ulcerative colitis and shows epistasis with solute carrier family 22, members 4 and 5. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1615–1622. doi:10.1002/ibd.20610
- Weinlich, R., Dillon, C.P., Green, D.R., 2011. Ripped to death. *Trends Cell Biol.* 21, 630–637. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.002
- Wijmenga, C., Gutierrez-Achury, J., 2014. Celiac disease genetics: past, present and future challenges. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59 Suppl 1, S4–7. doi:10.1097/01.mpg.0000450392.23156.10
- Xu, W., Joo, H., Clayton, S., Dullaers, M., Herve, M.-C., Blankenship, D., De La Morena, M.T., Balderas, R., Picard, C., Casanova, J.-L., Pascual, V., Oh, S., Banchereau, J., 2012. Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10. *J. Exp. Med.* 209, 1813–1823, S1–2. doi:10.1084/jem.20112142
- Xu, Y., Baker, D., Quan, T., Baldassare, J.J., Voorhees, J.J., Fisher, G.J., 2010. Receptor type protein tyrosine phosphatase-kappa mediates cross-talk between transforming growth factor-beta and epidermal growth factor receptor signaling pathways in human keratinocytes. *Mol. Biol. Cell* 21, 29–35. doi:10.1091/mbc.E09-08-0710
- Xu, Y., Shao, Y., Voorhees, J.J., Fisher, G.J., 2006. Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 27389–27397. doi:10.1074/jbc.M602355200

- Xu, Y., Tan, L.-J., Grachtchouk, V., Voorhees, J.J., Fisher, G.J., 2005. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function. *J. Biol. Chem.* 280, 42694–42700. doi:10.1074/jbc.M507722200
- Yagi, R., Zhu, J., Paul, W.E., 2011. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int. Immunol.* 23, 415–420. doi:10.1093/intimm/dxr029
- Yano, T., Ito, K., Fukamachi, H., Chi, X.-Z., Wee, H.-J., Inoue, K., Ida, H., Bouillet, P., Strasser, A., Bae, S.-C., Ito, Y., 2006. The RUNX3 tumor suppressor upregulates Bim in gastric epithelial cells undergoing transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4474–4488. doi:10.1128/MCB.01926-05
- Yoo, J.-O., Lim, Y.-C., Kim, Y.-M., Ha, K.-S., 2012. Transglutaminase 2 promotes both caspase-dependent and caspase-independent apoptotic cell death via the calpain/Bax protein signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 14377–14388. doi:10.1074/jbc.M111.326074
- Zhu, P., Martinvalet, D., Chowdhury, D., Zhang, D., Schlesinger, A., Lieberman, J., 2009. The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood* 114, 1205–1216. doi:10.1182/blood-2008-12-195768