



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***ESTUDIO DE MEDIADORES MOLECULARES DE LA LESIÓN DE
LA MUCOSA INTESTINAL EN ENFERMEDAD CELÍACA.***

Tesista: Bioquímica Yessica Allegretti

Director: Dr. Fernando 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 G. Chirido en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos, IIFP, CONICET – UNLP.

La Plata, Septiembre de 2015

A mis padres...

Agradecimientos.

En este trabajo de Tesis se resumen los resultados más salientes obtenidos a lo largo de un camino recorrido durante muchos años, en compañía de un grupo de personas maravillosas que han decidido dedicar su vida a descifrar algunos de los interrogantes que hacen a la inmunopatogenia de Enfermedad Celíaca, para con ello contribuir a mejorar la calidad de vida de mucha gente; me saco el sombrero por su dedicación y calidad humana, a mis amigos de ruta, de aquí y de allá, todo mi cariño y gracias por su afecto.

En especial a Fer por elegirme, por su capacidad, por enseñarme, por escuchar y confiar, por estar en cada detalle y porque sin su apoyo esto no sería lo mismo. Por ser de esos amigos que uno valora cuando le toca vivir momentos difíciles, porque sin su ayuda hoy mi realidad seguramente sería distinta, Fer gracias por estar ahí. A José Antonio por su amistad, calidez y dedicación, por ser un compañero excelente en esto de descubrir cómo pueden funcionar las cosas, por sus charlas y su capacidad. A Dave por su genialidad, carisma y alegría, por llenar de música nuestros pensamientos y por querer saber siempre un poquito más. A Eduardo por su dedicación, su capacidad de escuchar y brindar la posibilidad de crear, diseñar y diagramar estrategias de trabajo en equipo, por su calidez y simplicidad. A estas cuatro mentes brillantes mis respetos y todo mi afecto. A Emma y Afri, por su amistad y espontaneidad, por sus ideales y nobleza. A Costi, Maru, Sara, Romi, y Vani por compartir tantos momentos, experimentos largos, días enteros de trabajo entre tandas de mates, salidas, cursos e infinidad de momentos vividos.

A mis amigos de inmuno junto a los que construimos el Lisin, que hoy creció mucho y dió forma al IIFP, nos conocemos desde siempre, y compartimos mil historias, buenos momentos, buena gente, son muchos y los quiero a todos en general y a cada uno en especial, Alberto gracias por las charlas con café, Martín por creer en mi capacidad y estar en esos momentos difíciles, junto con Loli, Gri, Bel y Romi; a Pau, Mari, Guille, Agus, Reni, Yani, Pao, Ami, Dave, Nico, Dom, Juancito, Coqui, les agradezco por compartir muchos buenos momentos juntos, me ayudaron siempre que los necesité, forman parte de este gran esfuerzo porque conocen todos sus pormenores y saben lo que hoy significa para mi haber llegado hasta aquí. Sé que cuento con ustedes y aunque hoy nos veamos menos, siempre están en mi corazón. A todos ustedes y a los chicos nuevos mis mejores deseos en este camino.

A Jean Claude y su equipo por enseñarme tantas cosas, por su afecto, buena predisposición a trabajar y su gran organización; crecí mucho en su compañía.

A mis amigos del hospi que también son muchos y forman un gran equipo de trabajo, con sus idas y vueltas, con sus condimentos menos científicos pero muy humanos que hoy llenan mis días de buenas ondas y me apoyan también para que dé este gran paso, entre termos de mate y charlas descontracturadas, hoy agradezco su calidez humana y sé que con muchos vamos a mantener grandes amistades, a Rubito, Jor, George, Cris, Gastoncito, Gaby, Edu, Patri, Nila, Dani, Rochi, Vale

grande, Vale chiquita, Lau, Juancito, Bemí, Moni, Ceci, Nati, José, Cata, Heman, Nico, Tati, Carli, Dai, Fer, Nelly, Susi, y los últimos en llegar Vir y Lu.

A mis amigos de siempre, en especial a Kari por compartir tantos años y por tener esa mezcla de inocencia, pensamiento deductivo, capacidad de sorpresa y gran imaginación que la hicieron mi compañera ideal para compartir una carrera, y mucha vida. A Julito el grande, Mati donde quiera que estés, Alejita, Ceci, Julieta, Danita, Vero, Estefi, Fran, Wan y Maru gracias por ser, estar y fundamentalmente por hacerme mejor persona.

A toda mi familia, papás, mi esposo e hijas, mis hermanos y hermanas, primos, tíos, abuelos, de un lado, de otro, del corazón siempre... A Dieguito por ayudarme siempre con sus conocimientos y practicidad que hicieron de esta última etapa algo mucho mas sencillo, gracias negri porque con vos todo se hizo mas fácil, a Javito por ser el mas carismático de los tres y darnos siempre buenos consejos y por retarnos cuando nos equivocamos, gracias por querer siempre que mantengamos esto tan especial que tenemos; chicos por quererme tanto, y ser grandes amigos, gracias por compartir una vida, por ser como son y por apoyarme en mis proyectos, y ayudarme siempre que los necesito, no cambien nunca. A Marce por ser mi brújula en este camino, por nuestro amor que todo lo puede por haberte quedado acá para que completemos nuestro proyecto y por haber ampliado sin querer mis horizontes hacia otras perspectivas y así permitirme ser una persona más completa. A Sofi y Juli por llenar mi vida de amor y luz, por ser tan especiales, son mucho mas que lo que hubiese imaginado, gracias por estar conmigo en este camino y darme tanto amor, por mostrarme mis prioridades en todo momento, por permitirme el desafío de trascender y por recordarme que la capacidad de asombro y de pregunta es un bien maravilloso que no debemos perder nunca.

A Diana y Oscar, mi mamá y mi papá, por su amor incondicional, por ser los presidentes de mi club de fans, una organización algo selecta pero llena de gente que vale la pena. Por enseñarme y protegerme y por estar siempre incondicionales y darme fuerza aún en los momentos en los que la luz al final del camino es apenas una vela en la oscuridad de la noche. Por poder hacer, cuando no muchos pueden pensar con claridad. Por su coraje y su carisma y porque eligieron tenerse el uno al otro.

Abreviaturas.

CD	Células Dendríticas
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DH	Dermatitis Herpetiforme
DLG	Dieta libre de gluten
DM	Diabetes Mellitus
EC	Enfermedad Celíaca
ECR	Enfermedad Celíaca Refractaria
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento epidérmico
GALT	Tejido Linfoide Asociado al Intestino
GWAS	Estudios genómicos de asociación
HLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad en humanos
HSP	Proteínas de estrés térmico
IFN α	Interferón Alpha
IgA	Inmunoglobulina A
IHQ	Inmunohistoquímica
LIEs	Linfocitos Intraepiteliales
LP	<i>Lamina Propria</i>
MAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos
NK	células Natural Killer
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PGE ₂	Prostaglandina E 2
RE	Retículo Endoplásmico
RNA _m	Acido Ribonucleico mensajero
RRP	Receptores de Reconocimiento de Patrones
RT-qPCR	Transcripción Reversa y Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa
SNPs	Polimorfismos de nucleótido único
TcR	Receptor T
TG2	Transglutaminasa 2
UPR	Respuesta a Proteínas mal plegadas

Índice

Introducción General.....	5
Enfermedad celíaca. Definiciones. Conceptos generales.....	7
Evolución histórica del conocimiento de la Enfermedad Celíaca.....	7
Alergia al gluten	12
Sensibilidad al Gluten	12
Enfermedades asociadas a EC.....	13
Enfermedad Celíaca Refractaria	13
Prevalencia de Enfermedad Celíaca en el mundo	14
Alteraciones histológicas en intestino delgado	15
Asociación de EC con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad	16
Otros factores genéticos de riesgo	18
Diagnóstico de EC.....	21
Patogenia.....	24
Respuesta Innata frente a péptidos derivados de gluten.....	31
Respuesta adaptativa a péptidos derivados de gluten	36
Tratamiento, nuevas terapias.....	37
Objetivos	41
Capítulo 1. Expresión de MICA en Mucosa Duodenal.	45
Introducción.	47
Objetivos	50
Resultados	51
Expresión de MICA/B en intestino delgado.....	51
Niveles de RNAm de MICA en intestino delgado	53
Cambios en la expresión de MICA con la ingesta de gluten	53
Análisis de expresión de MICA en intestino delgado por inmunofluorescencia.....	54
Expresión de MICA en epitelio y en células de lamina propia.	55
Caracterización de las células MICA positivas en la mucosa de intestino delgado. ...	55

Expresión de MICA en enterocitos.....	56
Expresión de MICA en el compartimento intraepitelial.....	57
Expresión de MICA/B en la lámina propia.....	60
Discusión	63
Conclusiones.....	67
Materiales y Métodos.....	68
Capítulo 2. Regulación de la Expresión de MICA.....	73
Introducción.....	75
Actividad de chaperonas, rutas de degradación de proteínas mal plegadas, agregados proteicos, cuerpos de inclusión y agrosomas.....	76
Vías de señalización de estrés en retículo endoplásmico.....	79
Vías de activación dependientes de IRE1.....	80
Vías de activación dependientes de PERK.....	81
Vías de activación dependientes de ATF6.....	81
Interrelación de rutas de la UPR en la célula.....	82
MICA como marcador de estrés celular en tejido.....	83
Objetivos	84
Resultados	85
Estrés en la mucosa duodenal en EC activa. Estudios in situ de localización de MICA.....	85
Inductores de estrés y expresión de MICA. Estudios in vitro en células Caco-2.....	85
Estudios in vitro en células Jurkat.....	89
IL-15 y el péptido de gliadinas, p31-43, modulan la expresión de MICA.....	90
a.- Inducción de MICA en células Jurkat.....	90
b.- Inducción de MICA en células THP-1.....	91
c.- Inducción de MICA en intestino delgado.....	92
Discusión	94
Conclusiones.....	99
Materiales y Métodos.....	100
Capítulo 3. Mediadores Inflamatorios de la Lesión de la Mucosa Intestinal en EC.....	103

Introducción.	105
Objetivos	111
Resultados.	112
Análisis de la Células Dendríticas de la lamina propia en mucosa duodenal humana.	112
Localización de las células dendríticas en lamina propia duodenal.	112
Producción de IL-23 por Células Dendríticas de la mucosa intestinal.....	114
Análisis del patrón de citoquinas y sus receptores en la mucosa intestinal humana.	114
Rol del eje IL15/IL15R α en la patogenia de Enfermedad celíaca.....	116
Expresión aumentada de RNAm de IL15R α en pacientes celíacos.....	116
Análisis de expresión de IL15R α en mucosa duodenal.....	117
La expresión de IL15R α en duodeno es inducida por estimulación con IL-15.	118
Relación entre mediadores inflamatorios y la expresión diferencial del IL15R α	119
Participación de STAT1 en la señalización por IFNs.....	120
Estudio de FoxP3 como marcador de la función regulatoria.	121
Relación del eje IL-15/IL-15R α con la presencia de células iNKT (V α 24) en mucosa duodenal.	122
Participación de células V α 24 ⁺ en enteropatía activa.	123
Correlación entre los niveles de expresión de V α 24 e IFN γ en mucosa duodenal.	124
Los niveles de expresión de V α 24 y FoxP3 en duodeno revelan un perfil particular en enfermedad celíaca.	125
Discusión.	127
Conclusiones.....	133
Materiales y Métodos.	134
Perspectivas de trabajo y conclusiones generales.	141
Referencias.....	147

Introducción General.

Enfermedad celíaca. Definiciones. Conceptos generales

La Enfermedad Celíaca (EC) es una enfermedad intestinal crónica desencadenada en individuos genéticamente susceptibles como consecuencia de la respuesta inmune frente a un grupo de proteínas presentes en trigo, cebada, centeno y avena (Ludvigsson *et al.*, 2012). Por nuestros hábitos alimenticios, el trigo es el cereal que más utilizamos. El grupo de proteínas responsable de la patología, presente en dichos cereales, se conoce como prolaminas, o más comúnmente gluten

Como consecuencia de la ingesta de estas proteínas, se desencadena una respuesta inmune que incluye mecanismos tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, que conduce a la alteración estructural y funcional de la mucosa del intestino delgado (Maki M. and Collin P., 1997; Sollid LM. 2002). Estos cambios conllevan a una pérdida de la funcionalidad intestinal, observada como un cuadro severo de malabsorción. La dieta de exclusión de las proteínas tóxicas (dieta libre de gluten) revierte completamente las alteraciones histológicas en la mucosa intestinal y la sintomatología.

EC es una patología de alta incidencia. Considerando estudios en distintos países, se estima que la prevalencia en población general es cercana a 1:100. (Aggarwal *et al.*, 2012; Lionetti and Catassi, 2011). Estudios de prevalencia realizados en nuestro país arrojaron resultados similares (Gómez JC *et al.*, 2001; Gómez JC *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2012).

EC tiene algunas características de enfermedad autoinmune: presenta la asociación más fuerte al sistema HLA, siendo los alelos HLA-DQ2 y HLA-DQ8, determinantes en la susceptibilidad genética. Según la nomenclatura moderna, estos alelos se designan de la siguiente manera: (DQ2: HLA-DQA1*05 (cadena α) y HLA-DQB1*02 (cadena β), configuración cis: HLADQA1*0501-DQB1*0201; configuración trans: HLA-DQA1*0505 DQB1*0301 - DQA1*0201-DQB1*0202. y HLA-DQ8: DQA1*03DQB1*0302); (Abadie *et al.* 2011). Se producen autoanticuerpos, entre los que se destacan aquellos que reconocen a la enzima transglutaminasa 2 (TG2) (Dieterich *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia de las patologías autoinmunes, los mecanismos de daño inducidos por las proteínas alimentarias son revertidos y se observa recuperación histológica completa cuando el paciente sigue una dieta estricta libre de gluten (Meresse *et al.*, 2012). Es decir que, mientras que en las patologías autoinmunes una vez comenzado el proceso de daño éste es siempre progresivo, en el caso de EC, la eliminación del agente externo que desencadena la patología es suficiente para desactivar los mecanismos de daño.

Evolución histórica del conocimiento de la Enfermedad Celíaca

Las primeras descripciones sobre EC se atribuyen a Aretaeus de Cappadocia quien, en la segunda mitad del Siglo II AC, usó el término griego *koeliakos*, que significa “que sufren del intestino”. Esta palabra es la precursora de celíaco o *coeliac*, en inglés; para referirse a pacientes desnutridos, que presentaban deposiciones abundantes y de mal olor, y que empeoraban al ingerir trigo (Adams F., 1972); cereal cultivado por el hombre desde hace unos 15.000 años. En Gran Bretaña en 1888, Samuel Gee (Gee S., 1888) presentó un informe detallado de lo que llamó “afección celíaca” refiriéndose a su sintomatología clásica como una “indigestión crónica presente en personas de edad variable, pero especialmente en niños de 1 a 5 años de edad,... que presentan heces blandas pero no acuosas, pastosas y pálidas,... el abdomen se presenta frecuentemente distendido y se

acompaña de pérdida de peso...” y afirmó, que “la regulación de la alimentación es la parte más importante del tratamiento” (Walker Smith, 1988). Los estudios realizados en las primeras décadas del siglo XX, sugerían que la causa de la patología era una intolerancia a los hidratos de carbono presentes en los almidones de la harina de trigo. El empleo de dietas a base de frutas, en especial bananas, fueron los primeros tratamientos con resultados positivos (Haas SV, 1924). Estas observaciones condujeron a la idea de que los hidratos de carbono procedentes de frutas y verduras eran bien tolerados por los enfermos celíacos.

El pediatra holandés W.K. Dicke demostró que si se excluían los cereales trigo, cebada, centeno y avena de la dieta, los pacientes mejoraban. Si estos cereales se sustituían por arroz y maíz, los pacientes recuperaban el apetito, la absorción de grasas mejoraba y la diarrea con alto contenido graso desaparecía. También observó que durante la Segunda Guerra Mundial, período con fuerte restricción del consumo de trigo, se encontraban menos pacientes con esos síntomas o aquellos que los habían tenido, evidenciaban mejorías en sus cuadros clínicos. Al finalizar la guerra y reintroducir el consumo masivo de trigo (alimento habitual en Holanda) volvió a incrementarse el número de casos observados. De esta manera, Dicke fue quien demostró que las proteínas de trigo, cebada, centeno y avena eran el agente etiológico de la patología y propuso que la dieta estricta sin gluten de por vida era el único tratamiento que permitía la recuperación clínica de los pacientes (Van de Kamer *et. al.*, 1953).

El Dr. Dicke trabajó en estrecha colaboración con el bioquímico J.H. Van de Kamer, quien desarrolló el primer método para la determinación del contenido de grasas en heces, siendo éste el primer marcador bioquímico utilizado en diagnóstico de EC. En 1954, durante un procedimiento quirúrgico a un celíaco adulto (Pauley JW., 1954), se describió por primera vez la lesión intestinal característica de EC: atrofia de vellosidades. En 1958, Rubin CL. demostró que la patología tanto en el niño como en el adulto constituía una misma entidad clínica. Ya en 1960, los médicos dermatólogos relacionaron la Dermatitis Herpetiforme con la atrofia vellositaria, y observaron que la restricción en el consumo de trigo producía una notable mejoría en los pacientes. En 1980, Marsh MN, enfatizó el rol del sistema inmune como agente causal de daño y describieron las alteraciones histológicas de la mucosa intestinal utilizando un criterio de estadificación de la observación histológica que hoy sigue siendo ampliamente utilizado (Marsh MN, 1992).

La aparición entonces de EC está ligada a un cambio en los hábitos alimenticios del hombre desde la edad antigua, asociado a las mejoras que han sufrido las variedades de trigo ancestrales para satisfacer los requerimientos de consumo. El uso masivo del trigo como fuente primaria de una amplia variedad de alimentos es consecuencia de la versatilidad de este vegetal, que permite obtener alimentos a base de la generación de una masa, propiedad que no tiene ningún otro conjunto de proteínas vegetales. El amasado de la harina conduce a la formación de una estructura viscoelástica, denominada gluten, conformada por gliadinas y gluteninas, las proteínas mayoritarias del endosperma del grano de trigo. Estas proteínas fueron seleccionadas por el hombre de acuerdo al cambio en sus hábitos alimenticios ya que las variedades de trigos ancestrales presentaban un escaso contenido en estas proteínas.

Desde el punto de vista evolutivo, el comienzo de la agricultura está asociado a una vida más sedentaria en comunidades establecidas y migraciones más lentas. Los primeros hombres vivían en comunidades nómades y sus dietas se basaban fundamentalmente en el consumo de carnes y frutas.

En el neolítico superior surgieron asentamientos de antiguos cazadores y recolectores que comenzaron a explotar el cultivo de la tierra, y dieron comienzo entonces a la «Era de la agricultura». Las diferentes culturas adoptaron distintos vegetales autóctonos de las diversas zonas geográficas y aprendieron a cultivarlos. Con el paso del tiempo cada comunidad adoptó el cultivo de cereales como parte de su cultura y generó una gran diversidad de alimentos. Así en China el cereal más cultivado fue el arroz, en América central el maíz y en Europa el trigo. Con la evolución de los cultivos se instaló la modalidad del cruce de diferentes variedades de una misma especie para lograr mejoras en los rendimientos y la calidad de los productos obtenidos. La propiedad de formar masa, hizo del trigo el cereal utilizado más extensamente en la civilización europea u occidental.

Los primeros reportes del fraccionamiento de las proteínas del trigo a partir del grano fueron publicados por J Beccari en 1745 (Bailey, 1941). En 1908, TB Osborne (Osborne TB., 1908) propuso los protocolos de extracción fraccionada que permitieron la clasificación de las proteínas de los distintos cereales basándose en sus propiedades de solubilidad. De esta manera, las proteínas del grano de trigo se clasificaron en cuatro clases: *albúminas*, solubles en agua; *globulinas*, solubles en soluciones salinas (NaCl 10%), *gliadinas*, solubles en etanol acuoso (60-70%) y *gluteninas*, sólo solubles en condiciones más energéticas (ácidos, bases, agentes reductores y detergentes, urea, etc.). Gliadinas y gluteninas, así como sus homólogos en cebada y centeno, se denominan prolaminas debido a su alto contenido en aminoácidos prolina y glutamina, los cuales junto a fenilalanina pueden alcanzar el 60 al 80% de la composición aminoacídica en dichas proteínas. Además, la fracción prolaminas recibe nombre propio en los diferentes cereales (**Figura 1**), siendo conocida como secalinas en el centeno, hordeínas en la cebada, aveninas en la avena (Wieser H., 1998).



Figura 1. Cereales tóxicos en enfermedad celíaca.

Como mencionamos, el cultivo y uso masivo del trigo se debe a las propiedades fisicoquímicas distintivas de sus proteínas, es decir a la capacidad de formar masa. Como mencionamos esta estructura, llamada gluten, se obtiene a partir de la harina de trigo en un procedimiento de fraccionamiento sencillo que consiste en el lavado exhaustivo de la harina con agua. De esta forma, se separan aquellos componentes que son solubles en agua como el almidón, las albuminas y las globulinas. El residuo insoluble que consiste en una malla viscoelástica y cohesiva, capaz de retener gas, producto de la fermentación de levaduras, es conocido comúnmente como masa, y está formado por la asociación de gliadinas y gluteninas mediada por interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. Es así, que el gluten es la base del pan, el alimento más antiguo elaborado por el hombre. Estas proteínas además poseen uso tecnológico ya que a nivel industrial se

emplean como aditivo por su propiedad de formar masa, su capacidad aglutinante y generador de estructura, su capacidad de retención de agua y de colorantes, etc.

A lo largo de la historia, el hombre fue obteniendo sucesivas variedades de trigos por cruces de diferentes especies que presentaban mejoras en la capacidad de formación de masa y fue generando así variantes más versátiles y productivas. Sin embargo, esta práctica alimentaria condujo al consumo de proteínas para las cuales el hombre no había sido evolutivamente seleccionado. Parte de las proteínas que conforman el gluten son justamente aquellas inductoras del daño en intestino delgado en los pacientes celíacos.

La sintomatología clásica descrita detalladamente por primera vez en 1888 por Samuel Gee (Gee S., 1888) incluye síntomas, fundamentalmente gastrointestinales. El cuadro clínico típico encontrado inicialmente en niños, se presenta con diarrea crónica, vómitos, dolor abdominal recurrente, distensión abdominal, estreñimiento y retraso pondoestatural, entre otros. La mayoría de los síntomas pueden asociarse a la imposibilidad de absorber nutrientes a nivel intestinal. Existen además varias manifestaciones extraintestinales, cuyo origen es en algunos casos menos claro, que reflejan la naturaleza sistémica de la enfermedad, e incluyen fatiga crónica, anemia, disminución de la densidad mineral ósea, estomatitis aftosa, altos niveles de aminotransferasas, dolor en articulaciones/músculos, abortos espontáneos, epilepsia, neuropatía periférica (Fasano A and Catassi C. 2012).

Se conoce que la edad de presentación de la patología y su sintomatología son altamente variables. Las formas gastrointestinales típicas de los niños no son observadas tan frecuentemente en adultos, en los que signos extraintestinales y en algunos casos difusos son generalmente los motivos principales de la sospecha de EC en la consulta médica. El espectro clínico de EC incluye los casos sintomáticos con características intestinales y extraintestinales, así como las formas silenciosas reveladas solamente por la detección serológica.

Hoy en día las herramientas de diagnóstico para los desordenes relacionados al consumo de gluten han mejorado sustancialmente (Volta U and Villanacci V., 2011; Inomata N. 2009). En la década de 1980, la clasificación de estos desordenes era muy simple, ya que la enfermedad celíaca (EC) y la dermatitis herpetiforme (DH) eran las únicas enfermedades conocidas con un papel bien documentado del gluten en su patogenia. Además, se encuentran pacientes con síntomas intestinales y extraintestinales relacionados con la ingestión de gluten, pero sin evidencia de EC. Esta condición se describe como sensibilidad al gluten no celíaca, un trastorno que comenzó a ser documentado por la comunidad científica recientemente (Leonard MM and Vasagar B., 2014). La mayor complejidad en la presentación clínica y la existencia de nuevas entidades dentro de los desordenes relativos al consumo de gluten ha llevado al desarrollo de diferentes algoritmos para una nueva clasificación de tres desordenes asociados al consumo de gluten: EC, sensibilidad a gluten no celíaca y alergia al gluten (Sapone A *et al.*, 2012) (**Figura 2**). Cada trastorno exhibe una respuesta fisiopatológica única ante la ingesta de gluten, aunque puede existir una considerable superposición en la presentación clínica.

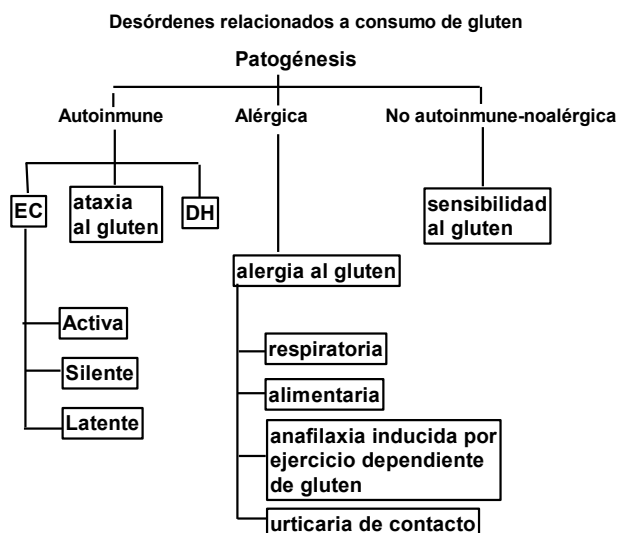


Figura 2. Nomenclatura y clasificación propuesta de los trastornos relacionados con el gluten. Adaptado de Sapone A. *et al.* 2012.

Los trabajos originales de Anne Ferguson (Ferguson A, *et al.*, 1993), mostraron que la presentación de EC podía ser clasificada en las formas: activa o sintomática, latente y silente o potencial. Estas formas pueden describirse según:

Forma Activa: esta forma corresponde a la descripción clásica de la presentación más evidente. Paciente con sintomatología gastrointestinal clásica, serología positiva y alteración histológica. Esta forma puede desarrollarse en cualquier momento de la vida, con dos picos de mayor incidencia, uno en la niñez en ambos sexos y el otro en mujeres durante el desarrollo puberal.

Forma Silente: esta forma se encuentra en pacientes celíacos asintomáticos HLA-DQ2 o DQ8 positivos. Existe alteración histológica en duodeno y serología específica positiva. El hallazgo de este tipo de pacientes sucede muchas veces cuando se evalúan parientes de primer grado de un caso celíaco, o en pacientes que presentan alguna enfermedad asociada a EC. De hecho el riesgo en este grupo está en el desarrollo de las patologías asociadas tales como enfermedades autoinmunes (Cosnes *et al.*, 2008) o menos frecuentemente malignizaciones (Elfström *et al.*, 2011).

Forma Latente: los pacientes son asintomáticos, o presentan signos difusos, son HLA-DQ2 o DQ8 positivos, presentan histología de la mucosa duodenal normal, pero tienen o han tenido serología positiva. Es común encontrar esta forma cuando se realiza una evaluación retrospectiva, en la que se encuentra que en el pasado el paciente tuvo signos asociados a EC. En este grupo, algunos pacientes podrían desarrollar alteraciones histológicas en duodeno. Es habitual encontrar un mayor número de linfocitos intraepiteliales TCR γ/δ y depósitos de anticuerpos IgA anti-TG2 en mucosa duodenal (Koskinen *et al.*, 2008; Ludvigsson *et al.*, 2012). La existencia de enfermos celíacos latentes o potenciales sugiere que la producción de anticuerpos anti-gliadinas o anti-TG2 no tiene una relación directa con el daño histológico en la mucosa intestinal (Meresse *et al.*, 2012).

Si bien en nuestro país no se han realizado estudios multicéntricos de screening masivo de EC, se estima que el número de pacientes con formas latentes o silentes sería similar a lo descrito en población europea. Si se tiene como único criterio la serología positiva, esto incluye a los pacientes con EC activa y también aquellos asintomáticos con las formas silentes y latentes, la

prevalencia estimada de EC es de 1: 100 (Aggarwal *et al.*, 2012; Lionetti and Catassi, 2011). Considerando que sólo 1 de cada 7 pacientes es diagnosticado (Catassi *et al.*, 1996), y los que llegan al diagnóstico corresponden mayoritariamente a casos que presentan la forma clásica, se infiere que la población de celíacos presenta una alta frecuencia de formas asintomáticas. (Catassi *et al.*, 1994; West J *et al.*, 2007).

Alergia al gluten

Dentro de las alergias a gluten podemos distinguir una forma clásica de alergia a los alimentos, con participación del tracto gastrointestinal, la piel y el tracto respiratorio; una forma típica de alergia por inhalación (asma y rinitis de panadero); la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo; y, más raramente, una forma de urticaria de contacto.

A diferencia de EC, los síntomas de la alergia al gluten son típicos de una hipersensibilidad mediada por IgE, incluyendo picazón e hinchazón en la boca, nariz, ojos y garganta; erupción cutánea o hinchazón; sibilancias en las vías respiratorias; síntomas gastrointestinales como calambres, distensión abdominal y diarrea; y anafilaxia que podría llevar a shock (Pietrzak M., 2012). A diferencia de EC, la alergia a gluten no causa daño gastrointestinal permanente (Pietrzak M., 2012).

Dentro de las alergias a gluten destacamos que, en aquella inducida por el ejercicio físico después de la ingestión de trigo, se conoce que un tipo específico de gliadinas, las ω 5-gliadinas, actúan como un factor desencadenante. El ejercicio dentro de las tres horas de consumo de trigo puede inducir una reacción adversa en personas susceptibles. En algunos casos, esto también puede ocurrir cuando el trigo se consume directamente después del ejercicio (Pasha I *et al.*, 2013). Los pacientes con alergia inducida por ejercicio pueden referir síntomas diferentes, que van desde la urticaria a anafilaxia y otras reacciones graves similares al resto de las alergias a gluten.

Sensibilidad al Gluten

En la actualidad existe creciente interés en una entidad clínica conocida como sensibilidad al gluten no celíaca, o en inglés "Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS)". Esta condición agrupa pacientes que no son enfermos celíacos ni con alergia al gluten mediada por IgE. Estos individuos son sensibles al gluten dietario y responden con mejoría clínica cuando siguen una dieta libre de gluten. Los signos clínicos son difusos y aún se desconoce la patogenia, sin embargo la detección de esta condición ha aumentado en los últimos años (Mooney PD *et al.*, 2013). Varios autores lo consideran un síndrome de patogénesis heterogénea con un rol fundamental de la inmunidad innata en su desarrollo, junto a otros aspectos como ser la presencia de un bajo grado de inflamación intestinal, y/o alteraciones en la función de barrera intestinal, y/o alteraciones en la composición de la microbiota intestinal. Dado que no existen marcadores ni alteración histológica, la detección de estos casos es difícil y muchos de ellos permanecen no diagnosticados. La prevalencia estimada de esta condición en población general oscila entre un 0.6% y un 6%, pero se considera que podría ser mucho mayor (Meresse, *et al.*, 2012). La sintomatología asociada incluye síntomas intestinales y extra-intestinales que se presentan concomitantes a la ingesta de gluten y mejoran o desaparecen con la exclusión del mismo de la dieta. No se han definido pruebas diagnósticas específicas para esta entidad y hoy el método de diagnóstico más exacto resulta ser un desafío realizado como doble ciego tanto con gluten como con placebo (Volta U *et al.*, 2013).

Enfermedades asociadas a EC

La EC clásica se encuentra frecuentemente asociada a otros desórdenes tales como déficit selectivo de IgA, diversas enfermedades autoinmunes, entre las que podemos citar diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoidea, tiroiditis autoinmune (Aggarwal *et al.*, 2012), hepatitis autoinmune, alopecia autoinmune (Ventura A *et al.*, 1999) y desordenes varios tales como Síndrome de Down. Se conoce que entre el 5% y el 10% de los pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1 desarrollan EC, mientras que del 15% al 20% de los pacientes celíacos presentan o desarrollarán patologías autoinmunes (Cosnes *et al.*, 2008).

En muchos casos EC es detectada en forma posterior a la enfermedad que se considera de base. El retraso en el diagnóstico y por consiguiente, en el establecimiento de la dieta libre de gluten, en muchos casos agrava o dificulta el manejo de la enfermedad de base. La importancia de la implementación de la dieta aquí es fundamental no sólo por el impacto sobre EC sino por que también puede influir sobre la patología asociada. Tanto desórdenes endócrinos, como autoinmunes y ciertos síndromes particulares asociados a EC son citados en la **Tabla 1**.

Tabla 1	
Condiciones asociadas a Enfermedad Celíaca	
Diabetes Mellitus Tipo 1	Tiroiditis autoinmune
Hepatitis autoinmune	Síndrome de Sjögren
Enfermedad de Addison	Lupus Eritematoso Sistémico
Gastritis Atrófica Autoinmune	Síndrome de Down
Síndrome de Turner	Síndrome de Williams
Defectos cardíacos congénitos	Déficit de IgA

Enfermedad Celíaca Refractaria

En un grupo reducido de pacientes que han sido diagnosticados tardíamente o aquellos con bajo cumplimiento de la dieta se ha observado la presencia de tumores. Sin embargo, los estudios en gran escala mostraron una importante divergencia de resultados y por lo tanto, no hay una evidencia clara de que los pacientes celíacos tengan mayor predisposición a tumores que la población general. Un caso particular es EC refractaria, definida como aquella condición en la cual el paciente diagnosticado y en dieta estricta libre de gluten no revierte la sintomatología observada, ni la serología ni las alteraciones histológicas de la mucosa intestinal, a pesar del seguimiento de una dieta estricta por períodos extensos. Esta condición se clasifica en ECR de tipo I y de tipo II.

El análisis de células obtenidas de la mucosa duodenal de los pacientes con ECR de tipo I mostró que el fenotipo de linfocitos intraepiteliales es coincidente con los encontrados en EC activa no complicada. No es claro el origen de esta condición pero se sabe que los pacientes responden a los tratamientos inmunosupresores. En contraste, en la ECR de tipo II, la población normal de linfocitos intraepiteliales CD3⁺ es progresivamente reemplazada por linfocitos T surgidos por expansión oligoclonal con un fenotipo anormal, y con uso predominante de ciertas cadenas de receptor T. La ECR de tipo II es considerada un linfoma T que resulta la más severa complicación asociada a EC (Malamut *et al.*, 2009; Meresse *et al.*, 2012). Este fenómeno se observa solo en un

número muy reducido de los casos con EC. Dichos linfocitos T parecerían ser activados por mecanismos no totalmente comprendidos (Di Sabatino *et al.*, 2006; Hùe *et al.*, 2004; Meresse *et al.*, 2004).

Se conoce que los linfocitos intraepiteliales en ECR de tipo II expresan marcadores de linfocito T y célula NK, poseen reordenamientos clonales del TcR, pero a diferencia de los LIEs normales, no expresan complejos TcR/CD3 o CD8 en membrana (Cellier *et al.*, 1998; Tjon *et al.*, 2008) y son fuertemente citotóxicos *in vitro* frente a líneas celulares epiteliales de tipo enterocito, lo que explicaría las lesiones epiteliales observadas en ECR de tipo II (Hùe *et al.*, 2004).

Prevalencia de Enfermedad Celíaca en el mundo

La distribución geográfica mundial de EC parece haber seguido la expansión del cultivo de trigo desde la Mesopotamia, entre los ríos Tigris y Éufrates, zona conocida como el “cercente fértil”, a lo largo de toda la costa Mediterránea, avanzando hasta Escandinavia. Antiguamente se consideraba que la enfermedad era exclusiva de las poblaciones Europeas, sin embargo, en la actualidad sabemos que EC se ha extendido, encontrando un rango de prevalencia de 0,25-1% en diversas regiones (**Figura 3**) (Aggarwal *et al.*, 2012; Lionetti and Catassi, 2011; Schapira M *et al.*, 2003; Cataldo F *et al.*, 2007). Es así que EC se observa también en lugares donde culturalmente no se consumía gluten en los que, como consecuencia de la globalización, se ha impuesto una dieta occidental a base de harinas de trigo, siendo éste el factor determinante de la aparición de EC. (Cataldo F *et al.*, 2007; Catassi C and Cobellis G, 2007). Un ejemplo se observa al analizar la población Saharai, donde se encuentra una prevalencia de EC del 5% (Catassi C *et al.*, 1999). En esta población, EC no había sido documentada hasta la actualidad. Si bien la población presenta una frecuencia del alelo HLA-DQ2 similar a la encontrada en el sur de Italia; el consumo de trigo se ha incorporado a su dieta solo hace pocas décadas.



Figura 3. Prevalencia de EC en el mundo. Tomado de Gujral N. *et al.* 2012.

En base a estudios serológicos, se han encontrado frecuencias similares a las europeas en diferentes poblaciones: países del norte y este de África (Marruecos, Argelia, Túnez, Libia y Egipto), del Oriente próximo (Palestina e Irán) y también en India y Latinoamérica (Argentina, Brasil, Cuba) (Rostami K *et al.*, 2004; Malekzadeh R *et al.*, 2005; Catassi C. 2005). De hecho, recientemente en un meta-análisis realizado en Latinoamérica en el cual se consideraron 72 estudios sobre prevalencia de EC en la región; se observó que la prevalencia general para EC en latinoamericanos se corresponde

con la observada para los europeos (Parra-Medina R *et al.*, 2015). La alta prevalencia de EC en distintos grupos étnicos y la extensión geográfica de su hallazgo llevan a considerarla como un problema de salud pública mundial.

Alteraciones histológicas en intestino delgado

Los cambios histológicos característicos observados en intestino delgado en EC son: atrofia vellositaria, hiperplasia de criptas e infiltrado linfocitario tanto en el compartimiento intraepitelial como en *lamina propria*. Estos hallazgos se observan mayoritariamente en intestino delgado proximal y en pocos casos aparecen lesiones en regiones más distales (Ferguson A *et al.*, 1975). Las alteraciones histológicas pueden variar desde cambios menores como el incremento del número de LIEs con una estructura histológica conservada, hasta un cambio severo en la arquitectura del tejido. En la enteropatía se observa un infiltrado de células mononucleares en *lamina propria* compuesto mayoritariamente por linfocitos T CD4⁺ y células plasmáticas. La enteropatía puede ponderarse mediante la relación altura de la vellosidad/profundidad de la cripta (relación V/C) (**Figura 4**).

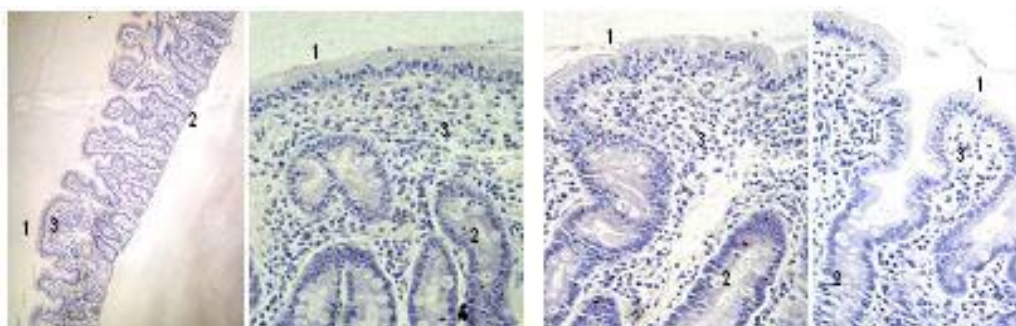


Figura 4. Alteraciones histológicas en duodeno en enfermedad celíaca. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina & eosina de intestino delgado proximal de un paciente pediátrico celíaco mostrando las alteraciones estructurales características de la arquitectura de la mucosa con enteropatía. 1. Atrofia de vellosidades, 2. Hiperplasia de criptas, 3. Infiltrado linfocitario. (Magnificación: A: 10x; B, C y D: 40x). Imágenes representativas obtenidas en nuestro laboratorio.

Se han empleado distintas formas de clasificación del daño en la mucosa intestinal, siendo la más utilizada la propuesta por Marsh MN., (Marsh MN. 1992). En esta clasificación se proponen grados o tipos de lesión definidos según:

- tipo 0: corresponde a una mucosa normal,
- tipo 1: se caracteriza por aumento del número de linfocitos intraepiteliales (LIEs),
- tipo 2: presenta aumento de LIEs e hiperplasia de criptas,
- tipo 3: enteropatía severa con lesión destructiva.
- tipo 4: lesión hipoplásica con atrofia total de vellosidades.

Con posterioridad esta clasificación sufrió una modificación en la que se diferenciaron tres diferentes tipos 3, conocidos como 3a, 3b y 3c (Oberhuber G *et al.*, 1999) (**Figura 5**).

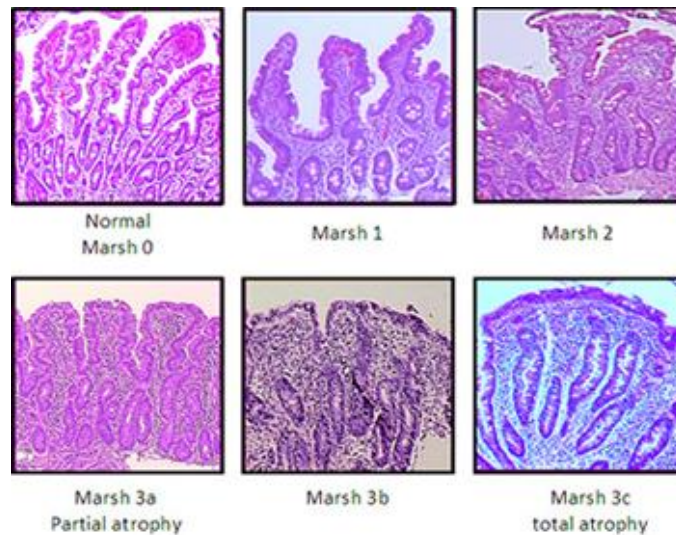


Figura 5. Imágenes ilustrativas de los diferentes tipos de lesión según la clasificación de Marsh modificada. Tomado de Fasano A. *et al.*, 2013. "Expanding the Spectrum of Gluten-Related Disorders". Página del Mass General Hospital for Children News.

Otra forma de clasificar las diferentes presentaciones en la histología al momento del diagnóstico fue propuesta por Drut R, del Hospital de Niños de La Plata (Drut R and Rúa EC, 2001). Ésta se basa en una evaluación morfológica de la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas. Mediante esta relación se determinan los diferentes tipos (Figura 6).

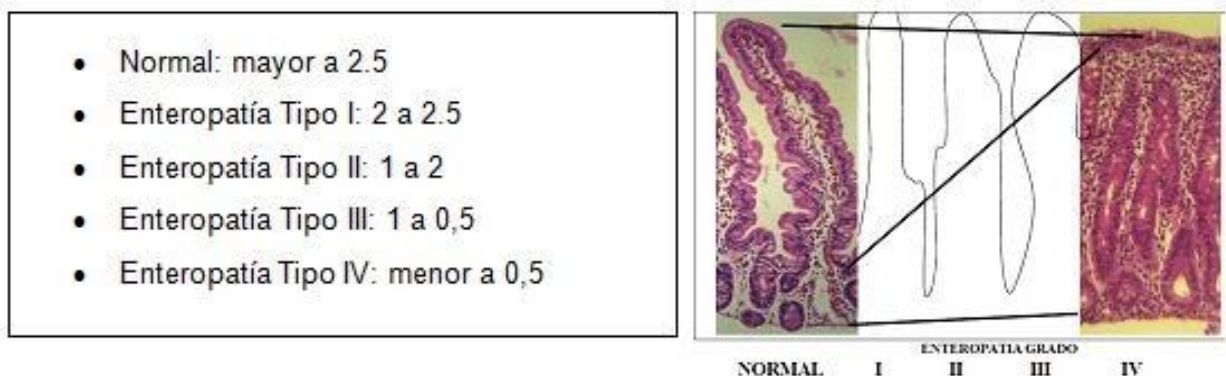


Figura 6. Esquema representativo de la Clasificación del Dr. Ricardo Drut mostrando los diferentes grados de enteropatía. Pacientes sin enteropatía presentan relación V/C > 2.5. Tomado de: Drut R and Rúa EC, 2001.

Asociación de EC con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad

La asociación de EC con genes pertenecientes al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA), es la más fuerte descrita para una patología de base inmune (Louka AS, sollid LM, 2003). La asociación más frecuente se observa con el alelo HLA-DQ2.5 (Fallang *et al.*, 2009); de hecho casi el 95% de los pacientes poseen una o dos copias de HLA-DQ2.5 codificadas por HLA-DQA1*05 (cadena α) y HLA-DQB1*02 (cadena β). En individuos con haplotipo DR3-DQ2, esta molécula es codificada por alelos DQA1 y DQB1 localizados en el mismo cromosoma (configuración cis: HLA-DQA1*0501, DQB1*0201); mientras que en individuos heterocigotas DR5-DQ7 - DR7-DQ2, es codificada por alelos localizados en cromosomas opuestos (configuración trans: HLA-DQA1*0505, DQB1*0301 - DQA1*0201, DQB1*0202, respectivamente) (Sollid *et al.*, 2012). La mayoría de los restantes pacientes celíacos tienen haplotipo DR4-DQ8 y expresan la molécula DQ8 codificada por

DQA1*03 DQB1*0302 (Sollid *et al.*, 2012). Aquellos pacientes que no expresan ni DQ2 ni DQ8 expresan alguna de las moléculas de cadena α o β (DQA1*05 ó DQB1*02) (Polvi A, 1998) (**Figura 7**).

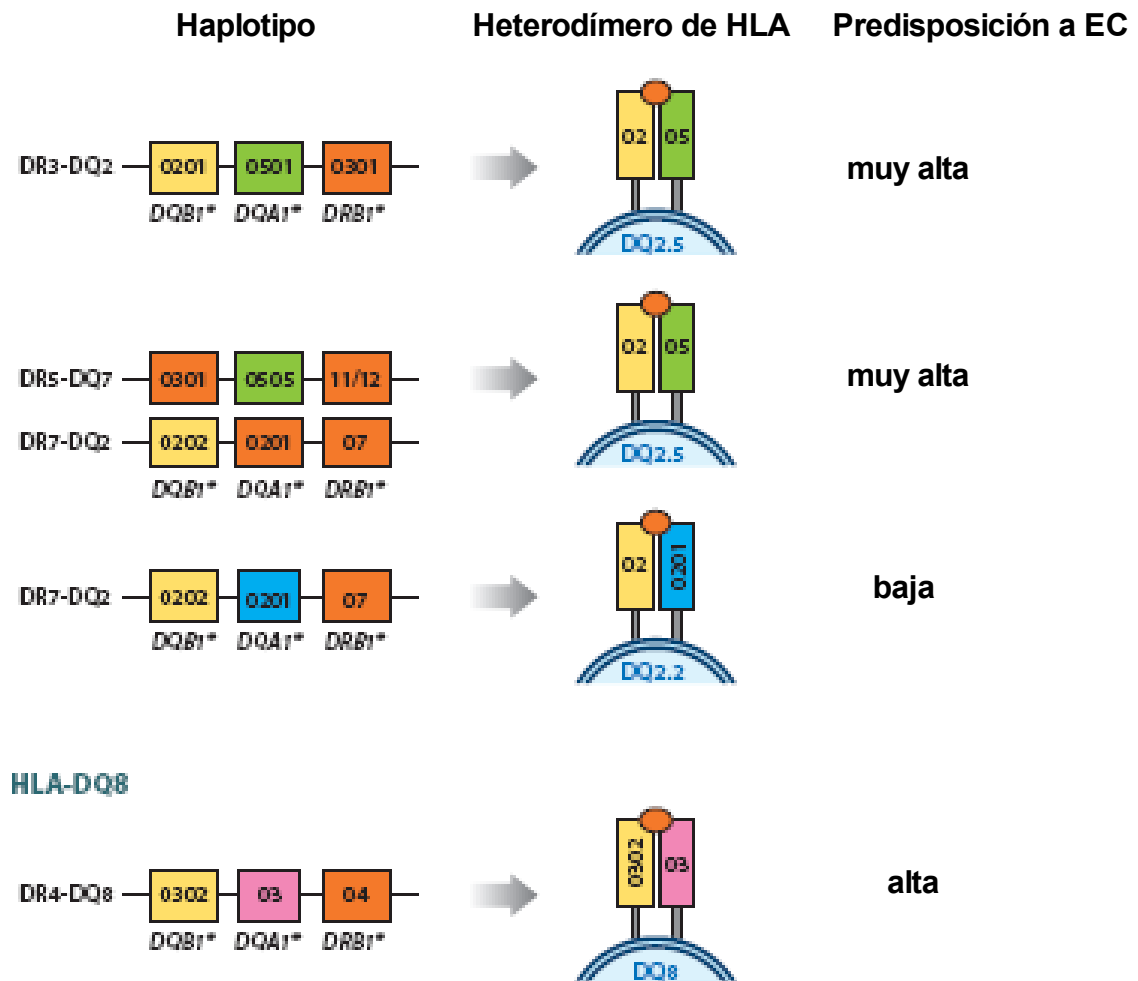


Figura 7. Esquema de la constitución de los heterodímeros HLA-DQ2.5 codificados en cis y en trans, HLA-DQ2.2 y HLA-DQ8 y su asociación con la susceptibilidad a desarrollar EC. Tomado de Abadie *et al.* 2011.

En conjunto, casi la totalidad de los pacientes celíacos expresan alguno de los alelos de susceptibilidad mencionados. La molécula HLA-DQ2 es un alelo frecuente en población general de origen europeo. Se encuentra en el 25-30% de la población. De estos solo el 4% o menos son pacientes celíacos. Lo que sugiere, como lo desarrollaremos más adelante, que otros factores, genéticos y no genéticos, están involucrados en el desarrollo de EC.

La particularidad de las moléculas HLA-DQ2.5 y HLA-DQ8 es que poseen sitios de unión de péptidos cargados positivamente, que unen preferentemente péptidos con residuos cargados negativamente en ciertas posiciones de anclaje P4, P6 y P7 para HLA-DQ2 y P1, P4 y P9 para HLA-DQ8 (Abadie *et al.*, 2011). Como se verá luego estas cargas negativas aparecen por la actividad de deamidación de la enzima transglutaminasa 2 (TG2) (**Figura 8**).

Se han establecido correlaciones entre la presencia de motivos predichos como sustratos de la enzima TG2, la afinidad de unión a moléculas HLA-DQ2 y la toxicidad de las prolaminas (Vader *et al.*, 2002). Dado que el HLA-DQ8 y HLA-DQ2.2 unen un menor número de péptidos de gluten que HLA-DQ2.5 y/o con menor afinidad esto explicaría el menor riesgo relativo de EC asociado con estas

moléculas (Bodd *et al.*, 2012; Fallang *et al.*, 2009). Finalmente, la susceptibilidad a EC se ha asociado a un efecto de dosis de los alelos de susceptibilidad, por lo que los individuos homocigotas DR3-DQ2 tienen el más alto riesgo de desarrollar EC (Vader *et al.*, 2003; Arranz 1997; Bourgey M, 2007). Se conoce que solo una pequeña fracción de individuos con HLA de riesgo y expuestos a las proteínas tóxicas desarrollan EC, esto indicaría que ambos factores, aunque necesarios, no serían suficientes. Esta observación fue analizada en un estudio de comparación a nivel mundial de la prevalencia de EC entre países dependiendo de la frecuencia de los haplotipos DR3-DQ2 y DR4-DQ8 y el consumo de trigo. Muchos de los países, pero no todos, se ajustaron a una curva de correlación; los casos que escaparon a la correlación fueron Finlandia y México con una prevalencia mucho mayor que la esperada y Rusia y Tunisia donde la prevalencia fue mucho menor que la esperada (Abadie *et al.*, 2011). La existencia de países que escapan a la correlación sugiere que otros factores genéticos y/o ambientales tendrían impacto en la aparición de EC. Además, se debe tener en cuenta que los datos de los que se dispone para cada país están sesgados muchas veces a ciertas aéreas o regiones con hábitos alimenticios particulares y/o diferencias genéticas, cuestión que no siempre refleja la realidad del país en su conjunto.

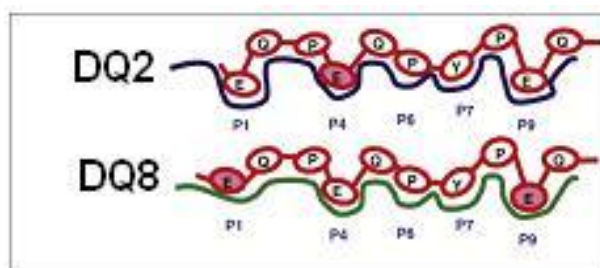


Figura 8. Esquema de los sitios de unión a péptidos con sus respectivas posiciones de anclaje para DQ2 y DQ8. DQ2 prefiere interactuar en su posición P4 con un anión glutamato (sombreado en rosa) mientras que DQ8 prefiere interactuar con aniones glutamato en P1 y P9 (sombreado en rosa). Q: glutamina, E: glutamato, P: prolina, Y: tirosina. (Tomado de Qiao S *et al.*, 2009).

Otros factores genéticos de riesgo

El concepto de EC como patología de base genética surgió al evaluar la familiaridad. Tomando los parientes de primer grado de un caso celíaco se observa que, en este grupo, el 10% son celíacos y mayoritariamente asintomáticos. Además, la concordancia entre gemelos monocigotas del 75% al 80% destaca la existencia de una fuerte predisposición genética asociada a EC. Sin embargo, la baja concordancia (no mayor del 35%) entre hermanos con HLA idéntico sugiere que otros factores intervienen en la susceptibilidad (Bevan *et al.*, 1999; Nistico *et al.*, 2006). A su vez, se conoce que solo 2-4% de los individuos que expresan HLA-DQ2/DQ8 desarrollan EC. El HLA-DQ2/DQ8 aparece, entonces, como el factor de predisposición mayor, asociado a un conjunto de genes con contribución menor.

Los primeros estudios que buscaban genes candidatos a participar en la susceptibilidad a la patología, fuera de la región del HLA, mostraron que existían polimorfismos (SNPs) asociados a EC. Entre ellos, se puede mencionar a $TNF\alpha$, donde se encontró aumento de frecuencia del alelo A (posición -308 del gen) en individuos celíacos (Wooley N, 2005; McManus R, 1996). Uno de los primeros trabajos sobre arrays de SNPs, mostró el estudio de más de 30000 polimorfismos comparando población de pacientes celíacos y controles donde se encontró asociación con la región de los genes de IL-2 /IL-21 (Van Heel DA, 2007). Más recientemente, estudios genómicos de

asociación (GWAS, genome wide associations studies) identificaron loci genómicos asociados a EC. De las regiones con genes identificados, la mayoría fueron genes asociados a la respuesta inmune (Dubois *et al.*, 2010; Hunt *et al.*, 2008).

Mediante estudios de genotipificación utilizando un Inmunochip diseñado para 183 loci de riesgo no asociados al HLA y asociados con enfermedades de base inmune, se demostraron 57 señales de asociación independientes, en 39 loci no asociados al HLA (Trynka *et al.*, 2011). Veintinueve de las 57 señales independientes totales no asociadas a HLA pudieron ser asignadas a un único gen. El total de estas señales podría explicar el 13.7% de la variabilidad genética en individuos celíacos de origen europeo (Trynka *et al.*, 2011). La mayoría de las variantes identificadas son variantes alélicas frecuentes (detectadas en más del 5% de los individuos en población general) y cada una contribuiría con un bajo riesgo positivo o negativo de padecer EC.

Mediante el uso de un meta-análisis de mapeo de datos genómicos para eQTLs (expression quantitative trait loci) se ha sugerido que alrededor del 50% de los SNPs asociados a EC podrían afectar la expresión de genes vecinos (Dubois *et al.*, 2010). Utilizando estudios de genotipado denso, los mismos autores sugirieron que solo muy pocas variantes asociadas a EC se encontraron dentro de regiones codificantes. Los genes no-HLA hasta la fecha identificados como contribuyentes al riesgo de padecer EC pueden clasificarse en base al sitio en el que ejercen su función en la cascada de señales inmunológicas (Abadie V. *et al.*, 2011). Existen algunos, como IL-21, que actuarían en diferentes puntos de la respuesta de linfocitos T y B; y otros, como el gen REL, que siendo parte de la vía de señalización del factor nuclear NF κ B estaría implicado en muchas funciones y tipos celulares. Algunos genes están implicados en la diferenciación tímica de linfocitos T CD4⁺ (como el gen THEMIS) o CD8⁺ (como el gen RUNX3). Otros son importantes en procesos inmunológicos que tienen lugar en el sitio de inducción de la respuesta como los nódulos linfáticos mesentéricos en donde regulan linfocitos T (ej. CD28 e IL-2) o linfocitos B (ej. ICOS e IL-21), activan y promueven una respuesta proinflamatoria (ej. IL-12A, TLR7/TLR8, IRF4, IL-1RL1 e IL-18R1). Finalmente, otros están implicados en la migración celular y regulación de funciones celulares efectoras (ej. MAP3K7 e IL-21), quienes son parte de la vía de activación de c-jun N-terminal Kinasa, que es crítica para el funcionamiento de receptores de activación de tipo NK expresados por LIEs citotóxicos.

En particular, nuestro grupo estudió la asociación de SNPs que mapean en regiones previamente señaladas por un estudio de GWAS. Se seleccionaron dos regiones genómicas que contienen a dos genes candidatos, RUNX3 y THEMIS. La asociación con RUNX3 no pudo ser confirmada en la población estudiada; sin embargo, se encontraron SNPs en la región de THEMIS que mostraron mayor asociación y se corresponden en localización con un gen vecino a THEMIS, PTPRK (Bondar *et al.*, 2014). Este es un ejemplo de como se puede complementar la información obtenida en estudios genéticos cuando se emplean diferentes estrategias experimentales. En general todos los genes identificados en estudios de riesgo para EC pueden integrarse en un modelo basado en estudios inmunológicos que involucre células pertenecientes a la mucosa intestinal (**Figura 9**).

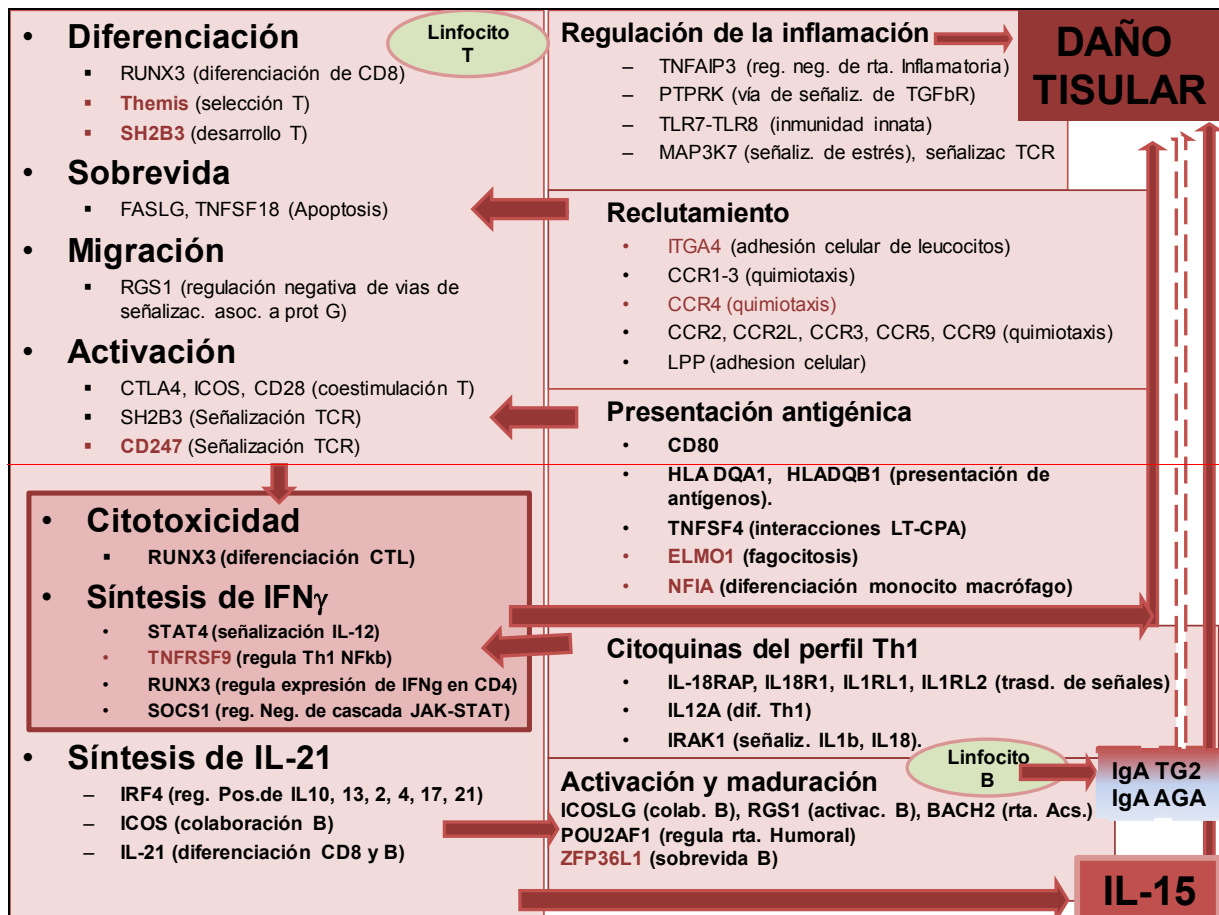


Figura 9: Posible rol de genes no HLA en la inducción de daño en la mucosa intestinal en EC. Los loci no-HLA asociados a EC estarían enriquecidos en genes que controlan la activación de linfocitos T (señalización vía TCR, presentación antigénica, y reclutamiento y diferenciación a células efectoras) y colaboración con linfocitos B. Los loci específicos de EC se muestran en rojo; aquellos compartidos con otras enfermedades autoinmunes, en negro. Se muestran los grupos de genes que hipotéticamente participarían en la activación de linfocitos T, citotoxicidad, producción de IL-21, producción de IgA. Se sugiere también la interacción entre IL-21 e IL-15 asociada a daño tisular. Adaptado de Meresse *et al.*, 2012.

Estas observaciones llevan a preguntarnos si las asociaciones observadas tienen significancia biológica y cuál sería la contribución exacta en la patogenia de EC. En este sentido, se plantea que los genes asociados a EC habrían sido seleccionados positivamente por conferir algún tipo de beneficio a los portadores, en particular podrían asociarse a la resistencia a cierta patología infecciosa. Dos estudios basados en esta hipótesis han utilizado el test de similitudes de haplotipos integrados para detectar signos de selección positiva para SNPs de regiones genómicas asociadas a EC. Solo tres regiones asociadas a EC mostraron evidencia de selección positiva: IL-18RAP, IL-12A, y SH2B3 (Abadie V. *et al.*, 2011; Zhernakova *et al.*, 2010). En este sentido, información sobre evolución indica que la selección para SH2B3 podría haber ocurrido entre 1200 y 1700 años atrás, en ese tiempo y en la zona geográfica desde donde se cree han surgido las variantes asociadas a riesgo, ha sido documentada una pandemia conocida como la plaga de Justiniano (481-750 DC). La causa más aceptada de la pandemia es la peste bubónica, enfermedad causada por la bacteria *Yersinia pestis* (Zhernakova *et al.*, 2010).

Analizando bases de datos que agrupan variantes de determinadas vías funcionales se han encontrado loci compartidos entre EC y enfermedades autoinmunes (Abadie *et al.*, 2011). En dicho estudio, se evidenciaron doce superposiciones entre EC y Diabetes Mellitus tipo 1, además se mostró

que los loci asociados a EC contienen genes asociados a actividades de receptores de quimoquinas, citoquinas y sus receptores y activación de linfocitos T y células NK.

El modelo actual considera entonces que existe un factor de predisposición mayor (alelos de susceptibilidad de HLA), y un conjunto de genes con contribución individual menor que, de manera no conocida aún, podrían determinar las variaciones observadas en las diferentes presentaciones clínicas de EC. En el contexto de múltiples genes contribuyendo a la susceptibilidad de EC, debemos destacar que factores ambientales, además de la ingesta de gluten, son determinantes en precipitar el desarrollo de la patología. De esta manera, se considera que infecciones virales, cambios hormonales, situaciones de estrés, etc, son disparadores de los mecanismos de patogenia (Merese B. *et al.*, 2012).

Podríamos entonces considerar un espectro de susceptibilidad a la enfermedad (Abadie *et al.*, 2011): en un extremo se encontrarían individuos con una gran cantidad de marcadores genéticos asociados a EC y necesidad limitada de factores ambientales, y en el otro, individuos con un número limitado de factores genéticos (por ejemplo, los genes HLA de riesgo, pero un número limitado de genes no-HLA) quienes requieren de múltiples factores ambientales para desarrollar la patología. El primer grupo de individuos desarrollarían EC ni bien el gluten se introduce en su dieta, mientras que el segundo tal vez nunca desarrolle la patología o lo haga ya en la vida adulta. Cómo el gluten influencia el desarrollo de la patología depende tanto de la cantidad consumida como del momento o edad de comienzo de la ingesta de gluten (Ivarsson A. *et al.*, 2000), lo que sugiere una compleja relación entre factores genéticos y ambientales en el desarrollo de la patología.

Diagnóstico de EC

Los diversos algoritmos diagnósticos para EC consisten en un screening inicial que utiliza estudios serológicos, seguido de un estudio confirmatorio anátomo-patológico de la histología observada en la mucosa duodenal obtenida por biopsia endoscópica; y en ciertos casos, estudios genéticos (**Figura 10**).

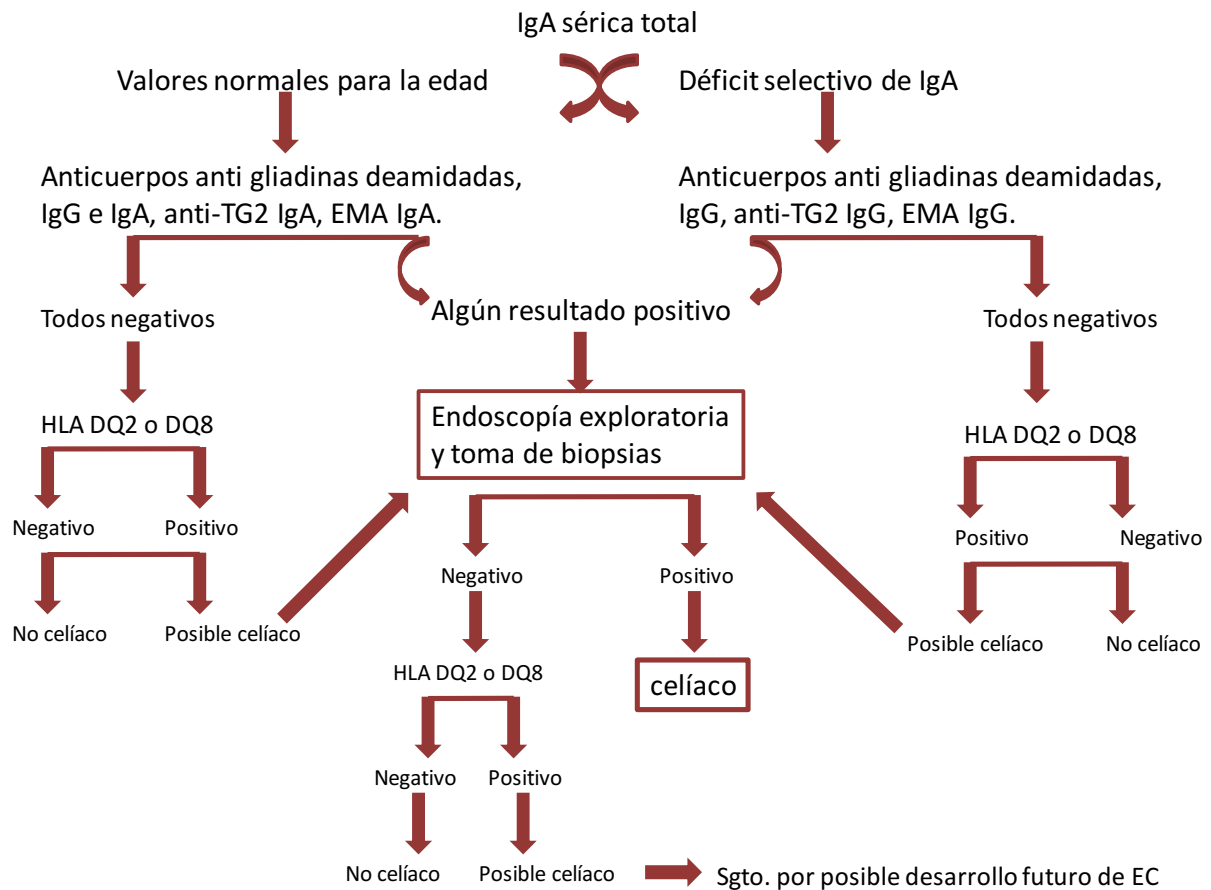


Figura 10: Ejemplo de Algoritmo diagnóstico de enfermedad celíaca.

El diagnóstico de EC conduce a establecer una dieta libre de gluten que debe ser estricta y cumplirse a lo largo de la vida. La dieta libre de gluten no debe implementarse si no hay un diagnóstico de certeza de EC.

Estudios serológicos

Se ha empleado la determinación de diferentes anticuerpos presentes en suero para diagnóstico de EC. Los más usados han sido: determinación de anticuerpos anti-transglutaminasa 2, anti-endomisio, y anticuerpos anti-gliadinas convencionales y más, recientemente anti-gliadinas deamidadas.

Determinación de anticuerpos anti-endomisio.

Esta es una determinación que se realiza por inmunofluorescencia utilizando cortes de esófago de mono. Allí se observa un patrón de fluorescencia característico en pacientes con EC que consiste en una especie de reticulado en "forma de panal de abejas" que es altamente específico de la presencia de anticuerpos séricos de isotipo IgA anti-endomisio, aunque la mayor parte de la reactividad está dirigida contra la transglutaminasa 2 (TG2). Esta prueba presenta una especificidad cercana al 100%, no presentando resultados falsos positivos. Como desventajas, requiere de un operador entrenado y presenta una tasa de falsos negativos de 20-30%, por lo tanto su sensibilidad es baja. Por estas razones, muchas veces se la utiliza como un ensayo de confirmación de otra serología. En pacientes con déficit selectivo de IgA, se analiza el isotipo IgG observándose un patrón de fluorescencia menos definido (Husby S *et al.*, 2012).

Determinación de anticuerpos anti-transglutaminasa 2.

El descubrimiento de TG2 como el principal antígeno reconocido en la prueba de antiendomiso condujo a desarrollar ensayos de ELISA basados en dicho antígeno purificado. Esta prueba presenta una buena capacidad para discriminar entre pacientes celíacos activos y controles, en particular cuando se detecta la reactividad del isotipo IgA (Leffler DA *et al.*, 2010). Inicialmente empleaba transglutaminasa aislada de hígado de cobayo o de eritrocitos, pero actualmente se dispone de proteína producida en forma recombinante.

Anticuerpos anti-gliadinas

La observación de la reactividad de los anticuerpos séricos anti-gliadinas fue la primera demostración molecular del efecto inductor de respuesta específica de las proteínas de la dieta en EC. Por muchos años se empleó la determinación de anticuerpos anti-gliadinas como parte del algoritmo diagnóstico de EC. Se evaluaba la reactividad IgG e IgA, siendo más específica la determinación de IgA. Sin embargo, la enorme variación en los extractos proteicos usados como antígeno y la falta de estandarización en los ensayos, condujo a una pérdida de la aceptación de este ensayo como parte de las pruebas diagnósticas. Empleando péptidos de síntesis se encontró que para ciertas secuencias, se observaba mayor reactividad cuando las mismas habían sido deamidadas en las posiciones donde había glutaminas. Esto condujo a la idea de que los péptidos deamidados podrían ser empleados como antígenos en ensayos de serología. El análisis de secuencias de gliadinas con cambios puntuales reconocidas por los anticuerpos séricos permitió establecer que ciertos patrones eran reconocidos con más afinidad. De esta manera, se concluyó que los péptidos deamidados: QLQFPQPELPYPQPQS y QPEQPQQSFPEQERPF presentaban el mayor reconocimiento y permitían generar ensayos con alta capacidad discriminatoria entre población control y celíaca (Aleanzi M *et al.*, 2001). Posteriormente, se construyeron péptidos de fusión análogos de fragmentos de gliadinas deamidadas, que son reconocidos por anticuerpos de pacientes y se los utilizó en formato de ELISA obteniéndose resultados comparables a los obtenidos en pruebas de determinación de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa-2 (Prause C *et al.*, 2009).

La determinación de anticuerpos anti-gliadinas y en particular, anti-gliadinas deamidadas se utiliza además con el fin de monitorear el cumplimiento de la dieta libre de gluten. Los anticuerpos de isotipo IgG frente a gliadinas deamidadas resultan ser útiles en el diagnóstico de EC en pacientes con déficit selectivo de IgA y en niños menores de tres años (Amarrì S *et al.*, 2013). Pese a todas las herramientas serológicas diagnósticas que tenemos hoy, se ha reportado que un 2% de los pacientes con EC presentan serología negativa, lo cual en ocasiones introduce dudas en el protocolo diagnóstico (Volta U *et al.*, 2011).

Endoscopia

Para la toma de biopsia intestinal se realiza una endoscopia alta. Existen diversos signos endoscópicos asociados a EC como, por ejemplo, el patrón en mosaico, el patrón nodular, la presencia de fisuras, la disminución del número y altura de los pliegues, vasos visibles. La detección de estos signos es una alerta para la toma de piezas de biopsias en casos en los que no existe sospecha previa de EC, en pacientes sometidos a este estudio debido a otras patologías. Los signos endoscópicos guían para la elección de las zonas de obtención de las piezas de biopsia. Esto es

importante ya que si bien es característico que el daño se observa en primera y segunda porción de intestino delgado, la alteración histológica puede estar distribuida irregularmente en EC.

Histología de intestino delgado.

Como se mencionó la endoscopia permite seleccionar las regiones de las cuales tomar las biopsias, las que luego deben ser correctamente orientadas para poder generar un taco de parafina que posibilite cortes en planos adecuados. Es justamente este punto uno de los principales problemas al momento de analizar las biopsias, ya que si están mal orientadas pueden conducir a interpretar incorrectamente la histología del tejido.

Normalmente se toman tres biopsias de diferentes regiones de duodeno para evaluar su histología, en algunos protocolos también se toman muestras de bulbo. Sobre cortes teñidos con Hematoxilina & Eosina, se analiza la histología en busca de elementos característicos de EC como son la atrofia de las vellosidades intestinales, o cambios morfológicos de la vellosidad, con reducción del número y altura. Se analiza además la existencia de hiperplasia de las criptas, que se observa como un ensanchamiento y alargamiento de las mismas; y la presencia de infiltrado linfocitario, tanto en el compartimiento intraepitelial como en la *lamina propria*.

La observación de estos cambios histológicos, asociados a la serología y la presentación clínica, confirma la presencia de EC. Aunque debe tenerse presente que en ocasiones alguno de esos signos pueden aparecer en otras condiciones, por ejemplo desnutrición severa, algunas parasitosis, infección por HIV. Por lo tanto, el diagnóstico siempre debe basarse en un conjunto de observaciones. En algunos casos, la rápida respuesta a la introducción de la dieta libre de gluten es un elemento de confirmación diagnóstica.

Diversas sociedades profesionales, entre las que se incluye la Sociedad Norteamericana de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología, y Nutrición (Hill ID *et al.* 2005), la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología, y Nutrición (Husby S *et al.* 2012), la Asociación Americana de Gastroenterología (American Gastroenterological Association, 2001) y el Instituto Nacional para la Salud (NIH Consensus State, 2004), han publicado guías para el diagnóstico y seguimiento de EC. Dichas guías proponen diversos algoritmos donde se pueden considerar varios elementos para hacer el diagnóstico.

Patogenia

El estudio de la patogenia de EC ha contribuido notablemente a una mejor comprensión de diversos mecanismos fisiológicos normales en mucosa intestinal. Antes de describir los mecanismos moleculares que hacen a la fisiopatogenia de EC, describiremos cómo se interrelacionan las diferentes células de la mucosa intestinal implicadas en los mecanismos de daño, cuando se encuentran en situación de homeostasis.

El epitelio intestinal tiene un rol crítico en los mecanismos de absorción de nutrientes, sin embargo, es cada vez más relevante su participación en diversos aspectos de la fisiología de la mucosa y en especial, en la respuesta inmune innata. Esta monocapa celular se organiza en criptas y vellosidades y contiene en la base de las criptas células madre pluripotenciales que permiten una renovación continua por su capacidad de regenerar todos los tipos de células epiteliales maduras (Peterson and Artis, 2014).

El epitelio contribuye en forma limitada a la internalización de moléculas desde el lumen por la vía paracelular (entre células) y la vía transcelular a través de los enterocitos (por endocitosis y transporte en vesículas). El pasaje paracelular está controlado por las uniones estrechas, que sólo permiten un pasaje muy selectivo de moléculas de pequeño tamaño. Por vía paracelular ingresan fundamentalmente moléculas como el agua e iones como el calcio.

La mayoría de las moléculas nutritivas que se encuentran en la luz del tubo digestivo atraviesan el enterocito. El transporte transcelular puede ser pasivo, por difusión libre o facilitada, o activo. En el primer caso, las moléculas cruzan libremente la membrana a favor de gradientes de concentración, mientras que en los dos últimos lo hacen mediados por proteínas transmembrana denominadas transportadoras. Por difusión pasiva entran el agua, etanol y muchos lípidos, y por difusión facilitada o por transporte activo entran la glucosa y algunos aminoácidos, di y tripéptidos e iones. Ingresan por endocitosis/transcitosis ciertas inmunoglobulinas que son endocitadas por los enterocitos mediante endocitosis mediada por receptor y posterior transcitosis, mecanismo que permite que las moléculas transportadas no entren en contacto con el citosol.

Si se consideran episodios individuales, estas vías de transporte son de baja eficiencia para el transporte de moléculas hacia la mucosa, pero si se tiene en cuenta la extensa superficie expuesta, la masa de antígeno que ingresa resulta cuantitativamente relevante. Aquí se debe considerar que los procesos inflamatorios causan alteración de las uniones estrechas y por consiguiente, un aumento de la permeabilidad intestinal.

Los componentes de la dieta o derivados de la microbiota pueden ser captados por células M, las que se encuentran en el epitelio que cubre las placas de Peyer, o por medio de células CX3CR1⁺ que emiten dendritas entre los enterocitos, un fenómeno descrito en ratón pero cuya función biológica y cantidad del material transferido resulta difícil de determinar.

Los mecanismos de traslocación y pasaje de componentes presentes en el lumen hacia el interior de la *lamina propria* son de alta relevancia ya que permiten fenómenos de regulación específicos. Brevemente, la respuesta frente a componentes dietarios y de la microbiota que estrictamente son no propios, es en general no convencional y está controlada por mecanismos únicos del sistema inmune de mucosa intestinal. En condiciones homeostáticas, las células dendríticas de la *lamina propria* capturan, procesan y presentan péptidos derivados de proteínas de la dieta y de la microbiota. Estas células dendríticas tienen propiedades funcionales particulares, ya que son inductoras de funciones regulatorias, producen TGF β y ácido retinoico. Estas células dendríticas migran a los ganglios linfáticos mesentéricos donde activan y diferencian linfocitos T vírgenes a linfocitos T reguladores inducidos (**Figura 11**). Estos linfocitos adquieren moléculas de homing ($\alpha_4\beta_7$ y CCR9) que los guiarán hacia la *lamina propria*, donde ejercerán funciones regulatorias, principalmente por secreción de IL-10. El entorno generado por IL-10, conjuntamente con TGF β y PGE₂, permite que las células dendríticas indiferenciadas, que arriban al tejido, se diferencien a células dendríticas regulatorias, comenzando nuevamente el circuito de regulación. Esta condición determina que, frente a los antígenos dietarios y componentes de la microbiota, la actividad regulatoria prevalezca sobre la respuesta efectora convencional (**Figura 11**). (Mora & von Andrian, 2004; Iliev *et al.*, 2007; Coombes *et al.* 2007; Mucida *et al.*, 2007).

La producción de IgA secretoria por células plasmáticas presentes en la *lamina propria* es uno de los mecanismos que más contribuye a preservar la homeóstasis del intestino (**Figura 11**). La IgA

secretoria tiene como función bloquear topográficamente tanto a macromoléculas como a microorganismos impidiendo el acceso al tejido, sin inducir respuesta inflamatoria.

Finalmente, destacamos la producción de péptidos antimicrobianos, especialmente por las células de Paneth, como mecanismo que permite controlar la microbiota y la infección por patógenos (Bevins CL. 2013; Clevers HC *et al.*, 2013).

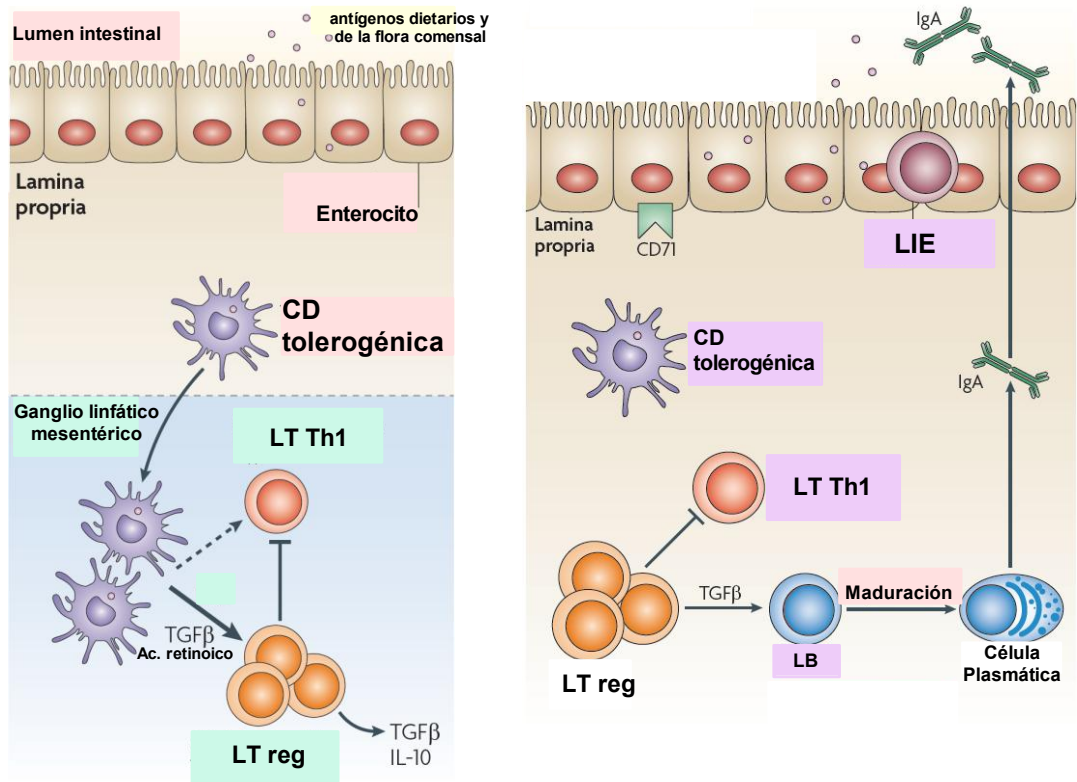


Figura 11. Células de la mucosa intestinal y mecanismos regulatorios implicados en mantener la homeostasis. Adaptado de Jabri and Sollid 2009.

Las células del sistema inmune pueden sentir la presencia de muchos patógenos potenciales utilizando receptores de la inmunidad innata. Estos receptores reconocen moléculas encontradas en virus, bacterias, hongos o células dañadas y les permiten responder rápidamente para controlar el daño celular, y/o el ingreso de patógenos. Estos receptores, se conocen como receptores de reconocimiento de patrones moleculares (RRPs) asociados a microorganismos (*Microorganism-associated molecular patterns*) (MAMPs). Existen seis diferentes familias de receptores: receptores de tipo Toll (entre los que se encuentran los TLR del 1 al 13), familia de receptores de tipo NOD (ej.: NOD1, NOD2, NLRPs, NLRCs, AIM2), familia de receptores de tipo RIG (ej.: RIG1, MDA5, LGP2), familia de receptores de tipo Inmunoglobulina (RAGE), familia de receptores de tipo lectina de tipo C (ej.: CLECs, LGALS3, CD94, MBL2, Regs) y familia de receptores de Formyl péptidos (FPR1, FPR2 y FPR3). Muchos de los organismos que normalmente habitan nuestro intestino son controlados mediante reconocimiento por estos receptores (Fritz JH *et al.*, 2008; Mills KH. 2011). Además, algunos de estos RRP reconocen moléculas derivadas del huésped (DAMPs) que sólo se expresan cuando las células están dañadas o muertas. Esto permite que el sistema inmune reconozca rápidamente y elimine el tejido dañado. Todas las células expresan RRP, pero diferentes combinaciones de estos receptores son expresados por diferentes tipos celulares.

Diferentes receptores muchas veces reconocen a la misma molécula, se estima que esta redundancia permite al huésped mantener su capacidad de respuesta por si el patógeno logra evadir un sistema de reconocimiento en particular. Este complejo sistema de reconocimiento utilizado por células de la inmunidad innata les permite responder de manera específica según el conjunto de receptores involucrados en el reconocimiento (Elliott *et al.*, 2014).

Las células dendríticas poseen varios de los receptores de la inmunidad innata, de hecho tienen miembros de cuatro familias, TLR, CLR, RLR y NLR, este hecho las posiciona como uno de los sistemas de reconocimiento más amplio y capaz de centralizar e integrar un universo muy complejo de señales, que incluyen también a las señales de estrés o daño del tejido.

Cuando las células dendríticas reciben señales vía dichos receptores se inducen varios cambios, entre ellos, modificación en el patrón de receptores de quimoquinas y como consecuencia, en su patrón de migración. En el caso particular de células dendríticas de la *lamina propria* de intestino se reduce la expresión del receptor CCR6, que las mantiene en la *lamina propria* y comienzan a expresar CCR7 que las guía a los ganglios mesentéricos en respuesta a las quimoquinas CCL19 y CCL21.

Las señales que inducen estos cambios pueden ser ligandos de los RRP tanto componentes derivados de los microorganismos como señales endógenas, o las señales de daño o alarminas. Durante su migración, las células dendríticas se modifican (Cella *et al.*, 1997), aumentan la expresión en superficie de moléculas de HLA con el consiguiente aumento en la capacidad de presentación, aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86 (ligandos de CD28/CTLA4 en los linfocitos T) o CD40 (ligando de CD40L en los linfocitos T). Además, estas células comienzan a producir citoquinas, dependiendo de qué tipo de respuesta debe montarse, sea Th1, Th2, Th17 o Treg, entre otras (Elliot E. *et al.*, 2014; Banchereau and Steinman, 1998; Palucka and Banchereau, 2002; Shortman and Liu, 2002). Una vez en los órganos linfoides secundarios, las células dendríticas reducen su capacidad para capturar antígenos, pero son muy eficientes en la presentación antigénica y activación de linfocitos T vírgenes. En la *lamina propria* se encuentran varias subpoblaciones de células dendríticas con funciones diferenciales. Recientemente, se encontró en ratón una población identificada por la expresión del receptor CX3CR1. Estas células, como dijimos, tienen la particularidad de emitir prolongaciones entre los enterocitos, que son activas tanto para sensar componentes presentes en el lumen como para capturarlos directamente (Chieppa *et al.*, 2006). Se ha visto que estas células no son migratorias y tendrían funciones críticas en transferir el material endocitado a células dendríticas, y en particular son productoras de IL-10 (Rescigno, 2011). Estas células CX3CR1⁺ son consideradas derivadas de monocitos/macrófagos (Mann *et al.*, 2013; Rescigno, 2011) y juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Farache *et al.*, 2013; Mowat and Bain, 2011). Otros sensores de ligandos provenientes de componentes de la microbiota en intestino son los enterocitos, además de conformar la barrera epitelial y transportar IgA a la luz intestinal, pueden producir péptidos antimicrobianos y citoquinas proinflamatorias (Artis, 2008). Los enterocitos son capaces de expresar ligandos de receptores de señales de daño o estrés celular, contribuyendo también a los mecanismos de respuesta frente a situaciones de daño tisular aún en ausencia de infección (**Figura 12**). Si bien se ha observado la expresión de moléculas de MHC de clase II, los enterocitos no presentan moléculas coestimuladoras

clásicas por lo que no participan como células presentadoras, aunque se ha postulado la liberación de exosomas que podrían ser captados por células dendríticas de *lamina propria*.

Existen además otras células asociadas al mantenimiento de la homeostasis intestinal. Los linfocitos intraepiteliales (LIEs), entre los que se encuentran: linfocitos T CD8⁺, linfocitos T γ / δ , células NK, células NKT y células NKT invariantes (iNKT). En general, estas células aunque emplean mecanismos diferentes están destinadas a detectar células infectadas o dañadas, e inducir muerte celular para su rápida eliminación (**Figura 12**).

La microbiota intestinal en contacto directo con las células del epitelio es considerada un factor importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Existen bacterias capaces de promover respuestas inmunes regulatorias, entre ellas las más conocidas son los microorganismos probióticos y bacterias conocidas como patobiontes capaces de promover respuestas inmunes inflamatorias. Los mecanismos homeostáticos se alteran frente a la aparición de microorganismos patógenos, los cuales disparan una respuesta inflamatoria inmediata (Round & Mazmanian, 2009; Maynard *et al.*, 2012; Hooper *et al.*, 2012).

Los mecanismos innatos con los que cuenta el intestino para responder de manera inmediata, específica y variada, comprenden diversas células, moléculas y factores solubles, que muchas veces son capaces de limitar y eliminar a los organismos patógenos. Como se mencionó existen también mecanismos de respuesta frente a señales de daño tisular que, de ser persistentes, conducen a amplificar de manera notable la respuesta inflamatoria. Estas señales conducen al establecimiento de una respuesta adaptativa que involucra la diferenciación de linfocitos T en el ganglio mesentérico. Estas células luego se relocalizarán en la *lamina propria* con la función de eliminar el estímulo inflamatorio (Maynard *et al.*, 2012).

Por lo tanto, en condiciones normales en el intestino se mantiene una respuesta regulatoria que controla los disparos inflamatorios, mientras que se encuentran activos mecanismos de detección y respuesta frente a microorganismos patógenos tendientes a eliminar la infección pero reduciendo, en lo posible, el daño tisular (**Figura 12**). Muchos de estos elementos están presentes en el caso de EC, aunque todavía hay varias etapas que desconocemos (Setty M. *et al.*, 2015; Jabri and Sollid 2009, Meresse *et al.*, 2012).

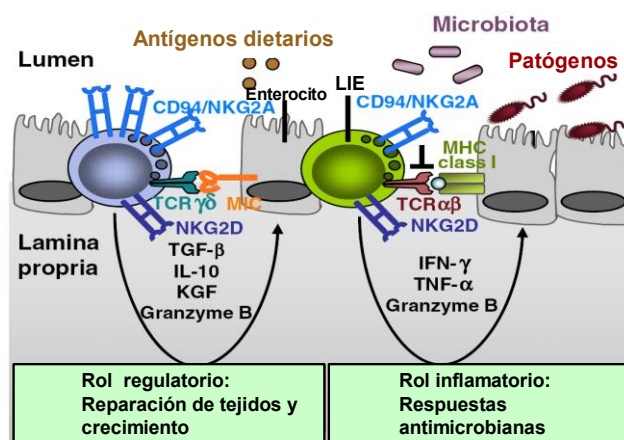


Figura 12. Rol de linfocitos intraepiteliales y enterocitos en el mantenimiento de la homeostasis intestinal frente a la colonización por bacterias comensales, la posible llegada de patógenos y la presencia de antígenos dietarios, adaptado de Abadie *et al.*, 2012.

Muy tempranamente se estableció que el agente desencadenante de EC son las prolaminas de trigo y sus componentes homólogos en los otros cereales (cebada, centeno y en menor medida en avena). Este conjunto de proteínas tiene estructuras aminoacídicas con secuencias repetitivas con alta proporción de los aminoácidos prolina, glutamina y fenilalanina, los cuales generan dominios de estructura secundaria y terciaria particulares. Se conoce que dichas secuencias no son digeridas de forma completa ni por las condiciones agresivas de pH del estómago ni por las enzimas presentes a lo largo del tracto digestivo. Péptidos de 10 a 50 residuos permanecerían sin degradarse en el lumen intestinal (Shan *et al.* 2002). Estos fragmentos de gran tamaño podrían ser transferidos por diferentes mecanismos a través de la capa epitelial, en especial por medio de CD71 que permite trasladar, en vesículas no degradativas, complejos inmunes gliadinas/IgA anti-gliadinas de manera muy eficiente hacia la *lamina propria* (**Figura 13**). CD71 es receptor de transferrina de alta avididad y en el hombre también es receptor de baja avididad para IgA polimérica (Moura *et al.*, 2001). En EC activa este receptor estaría sobre-expresado en el borde apical de los enterocitos del intestino delgado, permitiendo la unión de complejos de IgA secretoria-péptidos de gliadinas, con el subsecuente retrotransporte a la *lamina propria* por vía endocítica (**Figura 13**) (Matysiak-Budnik *et al.*, 2008; Lebreton *et al.*, 2012). Con esto, la IgA secretoria fallaría en su función normal de barrera protectora que excluye antígenos dietarios, transformándose en una especie de “caballo de Troya” facilitando el ingreso de péptidos intactos a la mucosa. También se ha descrito que TG2 participa en la endocitosis vía CD71 (Lebreton *et al.*, 2012). Es aceptado que el déficit selectivo de IgA es una patología que se asocia a EC, esto indicaría que la IgA secretoria no sería imprescindible para el desarrollo de la patología, igualmente debemos considerar que en estos pacientes la falta de una barrera eficiente de IgA secretoria facilitaría el pasaje transepitelial de péptidos de gliadinas (Wang *et al.*, 2011). En pacientes celíacos no tratados, con producción de IgA secretoria, este mecanismo de retrotranscitososis mediada por CD71 de complejos IgA secretoria-péptidos podría sostener la respuesta inflamatoria que luego aumentaría la permeabilidad epitelial a péptidos inmunogénicos.

El rol de la flora comensal en la degradación de gliadinas y proteínas relacionadas aún no se conoce en detalle; sin embargo se ha observado diferente composición de la microbiota entre celíacos activos y controles sanos (Forsberg *et al.*, 2004; Tjellstrom *et al.*, 2005; Sanz *et al.*, 2007; Di Cagno *et al.*, 2011; Nistal *et al.*, 2012), también se han documentado diferencias en aquellos pacientes celíacos en dieta libre de gluten (Tjellstrom *et al.*, 2005; Di Cagno *et al.*, 2011; Nistal *et al.*, 2012). En particular se ha observado en enfermos celíacos una disminución del contenido de *Faecalibacterium prausnitzii* y de bacterias del género *Bifidobacterium* (De Palma *et al.* 2010; Collado *et al.*, 2009) y un aumento de poblaciones potencialmente patógenas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus* spp (Nadal *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2012). Estos cambios podrían ser muy relevantes en la fisiología del sistema inmune de mucosas, es por ello que algunos autores plantean que la microbiota asociada a intestino delgado podría considerarse como un factor ambiental importante en el desencadenamiento de la patología, o al contrario, podría ser una consecuencia de los cambios en la mucosa intestinal que conduce a una selección particular de la microbiota (Jabri and Sollid, 2013). Estos interrogantes aun están en estudio tanto por sus implicancias en la etiopatogenia, como en la búsqueda de alternativas terapéuticas. Más allá de todo, y como ya se comentó, se requiere una conjunción de varios factores, además de la exposición a

gluten, de ciertos factores genéticos y ambientales entre los que podrían encontrarse cambios en la microbiota o infecciones entéricas.

Los péptidos que contienen motivos ricos en glutamina y prolina, como los obtenidos de la digestión de gluten, son excelentes sustratos de transglutaminasa 2 (TG2). Esta enzima se expresa en muchos tejidos en localizaciones tanto intra como extracelulares, en particular en intestino delgado se expresa en el ribete en cepillo y en la zona sub-epitelial de la *lamina propria*. Dentro de sus funciones, es capaz de convertir residuos de glutaminas de secuencias Q-X-P en residuos glutamato, aumentando así la afinidad de los péptidos por las moléculas HLA-DQ2.5 o DQ8 (**Figura 14**) (Abadie *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 2007). Los residuos de prolina además generan restricciones estructurales que hacen a los péptidos compatibles con los alelos DQ2/8 y no con otras moléculas de clase II (Bergseng *et al.*, 2005). TG2 interviene además en la formación de matriz extracelular y reparación tisular, participa en procesos de señalización celular, proliferación, movilidad celular y endocitosis. Si bien la enzima se encuentra muy expresada en intestino, no es constitutivamente activa, sino que se induciría en un contexto inflamatorio (Siegel M, 2008).

De esta forma, el proceso de digestión genera secuencias cortas de péptidos de prolaminas con alta estabilidad en la luz intestinal. Dentro de la diversidad de péptidos que se obtienen *in vitro* por digestión péptica/tríptica de gliadinas, existen dos clases de péptidos de acuerdo al efecto biológico que producen. Por un lado, se encuentra un grupo de péptidos considerados tóxicos per sé, entre ellos los más estudiados están el p31-43 y p31-49, que se obtienen a partir del p31-55 que surge del proceso de digestión. Este grupo de péptidos es capaz de generar alteraciones histológicas directas por mecanismos de tipo inflamatorio en epitelio, junto con otras funciones asociadas a procesos de proliferación celular. Por otro lado, se encuentran aquellos que requieren presentación y activación de linfocitos T y son considerados inmunogénicos. Estos últimos son capaces de estimular líneas celulares T restringidas a HLA-DQ2/8, obtenidas de intestino delgado o sangre periférica de pacientes con EC (Jabri and Sollid, 2013).

Hasta ahora no se ha encontrado ninguna diferencia en la actividad enzimática presente en lumen intestinal entre pacientes celíacos y controles, por lo que se asume que la composición de péptidos derivados de gluten presentes en intestino es similar en todos los casos. Esto lleva a preguntarse cual es el origen entonces de la respuesta tan selectiva que ocurre en pacientes celíacos.

Si bien se desarrollará con más detalle luego, podemos describir condiciones que podrían explicar el origen de EC.

- La presencia de HLA-DQ2/DQ8 es requisito indispensable para el desarrollo de la respuesta específica por parte de los linfocitos T CD4⁺ Th1.
- Existen genes, además de los alelos HLA mencionados, que muestran una asociación con EC los que, en conjunto, determinan una susceptibilidad incrementada.
- Existe una respuesta innata que, por algún mecanismo aún poco conocido, se encuentra exacerbada en pacientes celíacos e induce un patrón específico de respuesta frente a prolaminas que potencia la respuesta adaptativa y determina el desarrollo de la patología.

Respuesta Innata frente a péptidos derivados de gluten

Los péptidos p31-43 o p31-49 de α -gliadina, inducen una respuesta independiente de linfocitos T y moléculas de HLA-DQ2/8. Se ha descrito la existencia de efectos directos que estos péptidos derivados de gliadinas tendrían sobre el epitelio. Pueden inducir cambios del citoesqueleto que afectarían a la integridad de las uniones estrechas entre los enterocitos a través de un mecanismo dependiente de zonulina, observado en varios sistemas *in vitro* (Sander *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2006; Clemente *et al.*, 2003; Dolfini *et al.*, 2005), así como también en explantes duodenales de pacientes no celíacos estimulados *in vitro* con gliadinas (Drago *et al.*, 2006). Además, las gliadinas serían un potente estímulo para la activación de células dendríticas (Dolfini *et al.*, 2005; Jelinkova *et al.* 2004; Nikulina *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006; Cinova *et al.*, 2007). Las gliadinas ejercerían también un efecto citotóxico directo en varias líneas celulares humanas, donde inhibirían el crecimiento celular reduciendo la viabilidad celular (Hudson *et al.*, 1976; Rocca *et al.*, 1983). Finalmente, efectos tóxicos directos, como inducción de apoptosis, se observaron en la línea celular Caco-2 (Giovannini *et al.*, 1996; Giovannini *et al.*, 1997; Giovannini *et al.*, 2000; Giovannini *et al.*, 2003). También se ha observado que inducirían estrés de retículo endoplásmico en enterocitos y células Caco-2 (Caputo *et al.*, 2012, Luciani *et al.*, 2010). Además, los péptidos p31-43 y p-31-49 favorecerían la proliferación de líneas celulares tipo enterocito y de enterocitos de pacientes con EC por modular el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Estos péptidos específicamente retrasarían la maduración de las vesículas endocíticas, retrasando así la inactivación del EGFR por interferir con su endocitosis, lo que explicaría en parte, los cambios observados en mucosa intestinal con EC activa: una mayor tasa de recambio celular en epitelio, con hiperproliferación de criptas y presencia de células diferenciadas en las criptas (Barone *et al.*, 2007, 2011). Estos mecanismos se discutirán en detalle en los capítulos 2 y 3.

Esta hipótesis que plantea un efecto tóxico directo de algunos fragmentos de gliadinas a través de un mecanismo HLA-DQ2/DQ8 independiente llevó a proponer que, ante el consumo de gluten, el desarrollo de una respuesta innata frente a péptidos de prolaminas ocurriría en todos los individuos, fuesen o no celíacos, diferenciándose los celíacos por su capacidad de montar una respuesta exacerbada que determinaría el desencadenamiento de la respuesta adaptativa y los mecanismos de daño. En un estudio, utilizando cultivos de explantes duodenales de pacientes controles no celíacos y de pacientes celíacos en DLG, estimulados con gliadinas o péptidos sintéticos, se observó que, tanto las gliadinas como sus péptidos derivados, son potentes inductores de mecanismos de la respuesta innata en todos los individuos (Bernardo *et al.*, 2007).

La activación de la respuesta innata por fragmentos derivados de gluten parece necesaria para el desarrollo de la enteropatía. Modelos experimentales en ratón han mostrado que una respuesta T CD4⁺ frente a gluten no es suficiente para desarrollar EC e inducir daño tisular, ya que no se ha observado enteropatía en ratones que expresan HLA-DQ8 y CD4 humanos (Black *et al.*, 2002), tampoco en ratones transgénicos para HLA-DQ2.5 y TCR específicos de gliadinas, luego de ingesta de gluten (De Kauwe *et al.*, 2009; Du Pré *et al.*, 2011).

La inducción de una respuesta de linfocitos T CD4⁺ Th1 frente péptidos derivados del gluten sugiere que las células dendríticas de la mucosa intestinal de pacientes con EC presentan un fenotipo proinflamatorio en lugar de tolerogénico (**Figura 13**). Asociado a este concepto se puede considerar que existiría una alteración del microambiente intestinal que afecta la diferenciación y/o función de las

células T regulatorias FoxP3⁺ en los pacientes con EC (Jabri and Sollid, 2009). También se ha propuesto que IFN α , citoquina producida por diversas fuentes celulares en la mucosa de enfermos celíacos (Monteleone *et al.*, 2001; Di Sabatino *et al.*, 2007), e IL-15, producida por enterocitos (Jabri *et al.*, 2000; Mention *et al.*, 2003) y células mononucleares de *lamina propria* (Maiuri *et al.*, 2000), podrían jugar un papel crítico en la promoción de la diferenciación de las células dendríticas proinflamatorias.

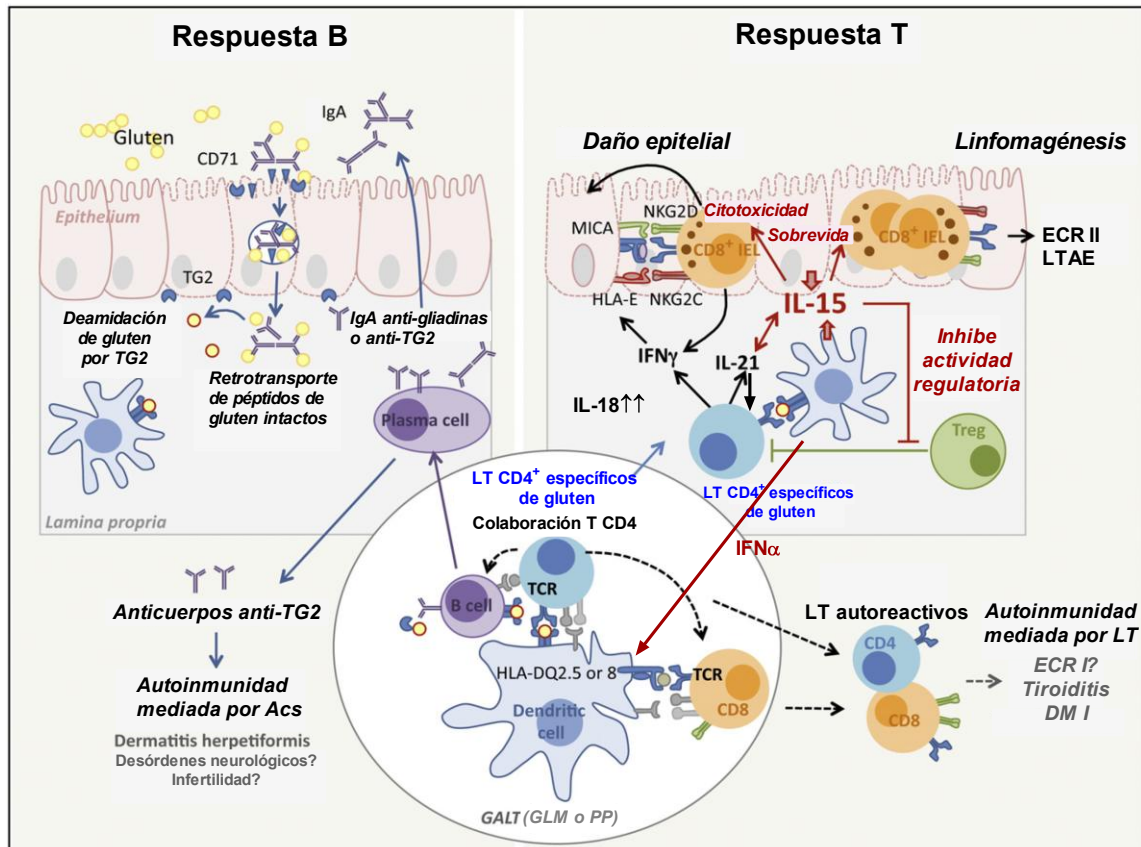


Figura 13. Esquema de los mecanismos de la respuesta innata y adaptativa tanto B como T frente a péptidos derivados de gluten en individuos susceptibles. Adaptado de Meresse *et al.*, 2012. A la izquierda se muestra la respuesta de células B. Linfocitos B diferenciados en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, centro) migran a la *lamina propria* (LP) y se diferencian en células plasmáticas productoras de IgA dimérica secretoria. En EC activa, se forman en el lumen intestinal complejos de IgA secretoria y gluten que pueden unirse al receptor CD71 presente en la superficie apical de los enterocitos, lo que resulta en su rápido retro-transporte a LP. La unión de CD71 a IgA secretoria puede también activar la transducción de señales en las células epiteliales. Estos mecanismos pueden exacerbar las respuestas inmunes. Se muestra a la derecha la respuesta de células T. En EC activa, IL-15, producida por los enterocitos, las células dendríticas y los macrófagos de LP, favorece la activación de LIEs CD8⁺ citotóxicos productores de IFN γ que albergan receptores de células NK: NKG2D y NKG2C con sus respectivos ligandos MICA y HLA-E sobreexpresados en enterocitos. IL-15 e IL-21 también pueden cooperar y permitir que los linfocitos T CD8⁺ autoreactivos respondan a ligandos agonistas débiles autoreactivos del TcR (auto-ligandos) (parte inferior derecha). IL-15, favorece la acumulación de linfocitos T CD8⁺ activados mediante la estimulación de sus mecanismos de supervivencia y la inhibición de sus respuestas inmunoregulatorias, aumentando aún más el riesgo de desarrollar enfermedades de tipo autoinmune T dependientes como DM tipo 1, tiroiditis, y tal vez EC Refractaria de tipo I (ECR I). Por último, IL-15 puede promover la aparición de LIEs inusuales que presentan características de células NK y T y pueden derivar en linfomas T capaces de conducir a lesiones epiteliales; siendo el linfoma primero intraepitelial (ECR de tipo II) y secundariamente, linfoma T asociado a enteropatía (LTAE).

El rol importante que tiene $\text{IFN}\alpha$ en la patogénesis de EC se apoya en observaciones consistentes con la presencia de un disparador viral de la enfermedad y con la inducción de EC en casos con fuerte contribución de la vía dependiente de $\text{IFN}\alpha$. En niños se ha correlacionado el inicio temprano de EC con evidencias serológicas de infecciones repetitivas por rotavirus (Stene *et al.*, 2006). En adultos, hay reportes de casos de desarrollo de EC en pacientes con hepatitis C tratados con $\text{IFN}\alpha$ (Cammarota *et al.*, 2000; Bourlière *et al.*, 2001). Además, es conocida la asociación del Síndrome de Down con EC (George *et al.*, 1996). Se conoce que el cromosoma 21 contiene el gen que codifica para el receptor de $\text{IFN}\alpha$, lo que explica por qué las células de los pacientes con síndrome de Down muestran aumento de los niveles de expresión del receptor de $\text{IFN}\alpha$ y una mayor respuesta a los IFN de tipo 1 (Gerdes *et al.*, 1993). Además, se ha mostrado que en modelos murinos la infección por rotavirus induce la producción de CCL5 e interferón λ de tipo 1 junto al reclutamiento de LIEs citotóxicos (Pott *et al.*, 2012). También en ratones se ha asociado la activación de TLR3 por poly I:C con la activación de TG2 y la producción de IL-15 (Dafik *et al.*, 2012). La existencia de un disparador viral de la patología, como por ejemplo serían las infecciones por rotavirus es, sin duda, una idea atractiva y sobre esta se han apoyado estudios hechos en ratones, sin embargo, aun no ha sido formalmente demostrada (Plot and Amital, 2009). La asociación entre EC e infecciones por rotavirus (virus a DNA de simple hebra) es interesante ya que los estudios genómicos mostraron asociación con TLR7 y TLR8, receptores para DNA de simple hebra (Abadie, 2011; Dubois *et al.*, 2010).

Diversos estudios han mostrado que IL-15 (Jabri B *et al.*, 2000; Mention *et al.*, 2003; Ben Ahmed *et al.*, 2009) e $\text{IFN}\alpha$ (Monteleone *et al.*, 2001) se encuentran aumentados en mucosa de enfermos celíacos y son centrales en los mecanismos de daño en EC. Sin embargo, no se han hallado mutaciones asociadas directamente a las regiones codificantes o regulatorias de dichos genes, lo que estaría sugiriendo un efecto indirecto de otras mutaciones en otros genes que se desregularían y podrían modular los niveles de estas citoquinas. Empleando resultados obtenidos en GWAS y bases de datos (Jensen *et al.*, 2009) se generó una red funcional que conecta 40 de los 64 genes asociados a susceptibilidad a EC (Abadie *et al.*, 2011). Se observó que varios de estos genes tenían asociación directa con IL-15, $\text{IFN}\alpha$ o ambos (**Figura 14**).

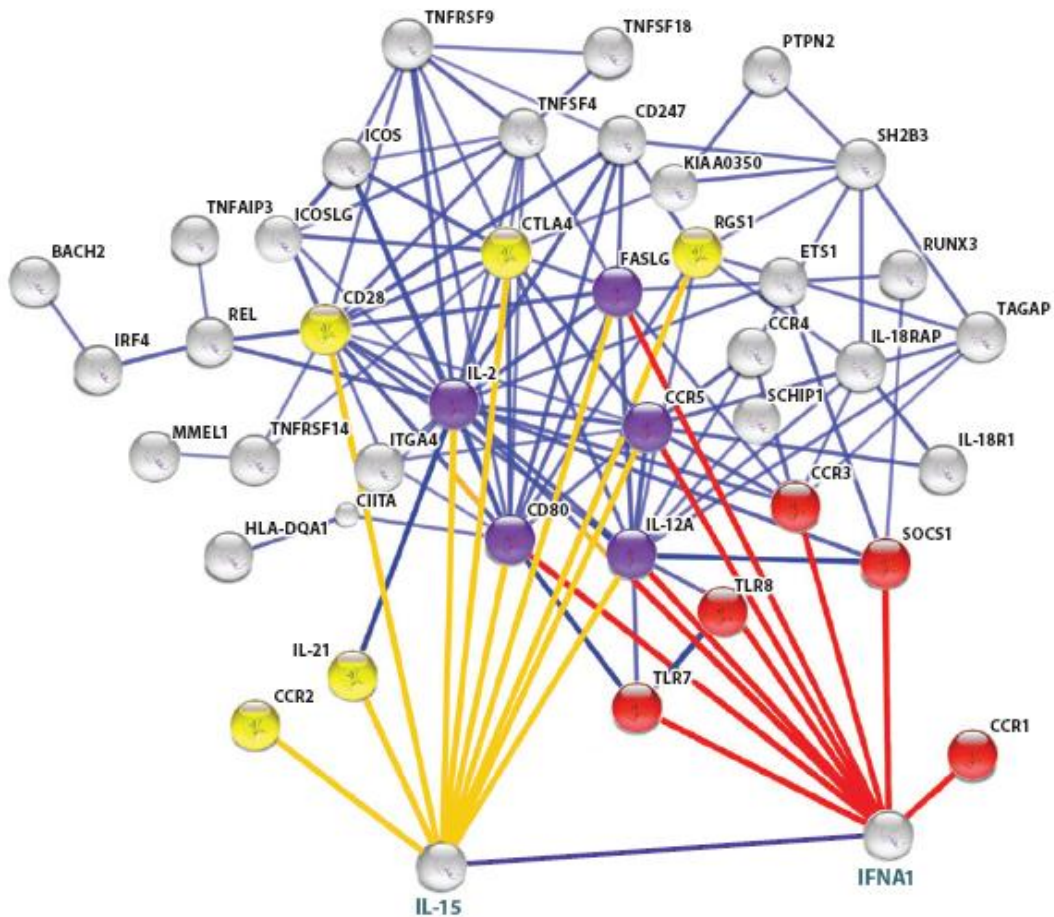


Figura 14. Red de interacciones funcionales conocidas entre genes asociados a EC y marcadores inmunológicos claves de EC. Mediante el uso de la base de datos STRING se encontraron interacciones funcionales conocidas entre los genes de susceptibilidad para EC; IL-15 e IFN α . La base de datos STRING reúne información sobre interacciones proteína-proteína conocidas y predichas, en base a numerosas fuentes tanto experimentales como métodos de predicción computacionales y textos publicados. Muchos genes de susceptibilidad a EC interactúan funcionalmente con IL-15 (amarillo), IFN α (rojo) o ambos (violeta). (Tomado de Abadie *et al.*, 2011).

Esta observación apoyaría la idea de que el aumento en IL-15, IFN α o ambos; resultaría de variaciones funcionales y podría relacionarse con las variadas formas de presentación de EC (Abadie *et al.*, 2011).

Otra citoquina clave que está sobreexpresada en mucosa celíaca es IL-21 (**Figura 13**) (Fina *et al.*, 2008). Esta citoquina sería producida por linfocitos T CD4⁺ Th17 en respuesta a péptidos derivados de gluten (Bodd *et al.*, 2010). Se conoce que IL-21 podría potenciar los efectos de IL-15 en la mucosa con EC. Aunque algunos aspectos del perfil Th17, se han encontrado en EC activa, existen posiciones encontradas sobre la expresión de sus mediadores en mucosa duodenal. Este punto será abordado con detalle en el capítulo 3.

IL-18 también se presenta como una citoquina relevante en la mucosa intestinal. Se sabe que en mucosa intestinal en EC activa hay expresión aumentada de IL-18. Esta citoquina puede ser producida por las células dendríticas y células del epitelio y, a diferencia de IL-12 no actúa sobre linfocitos T vírgenes sino sobre células de memoria y efectoras potenciando la expresión de IFN γ dependiente de IFN α (Salvati *et al.*, 2002).

Por otro lado, se encuentra IL-15, citoquina que favorece la supervivencia, activación y proliferación de los LIEs, en particular las células con receptores NKG2D (Hue *et al.*, 2004; Meresse *et al.*, 2004), cuyos ligandos son las moléculas MICA/B presentes en los enterocitos y otras células de mucosa intestinal (**Figura 13**) (Allegretti *et al.*, 2013; Maiuri *et al.*, 2000; Maiuri *et al.*, 2001; Mention *et al.*, 2003). IL-15 favorece la reprogramación de los LIEs al activar cascadas de señalización con inducción de perforinas/granzimas y Fas/FasL que contribuyen a desencadenar mecanismos de citotoxicidad (Di Sabatino *et al.*, 2006; Ebert, 2005; Meresse *et al.*, 2004). Los detalles de la interacción NKG2D-MICA/B como también aspectos asociados a la expresión de MICA/B en mucosa duodenal y su rol en el mecanismo patogénico de EC se discuten en el capítulo 1. Por otra parte, los detalles funcionales de la señalización IL-15/IL-15R α como también estudios de su expresión *in situ* se detallan y discuten en el capítulo 3.

En EC se observa un aumento de los linfocitos T γ/δ , capaces de reconocer señales de estrés celular y preservar la integridad del epitelio mediante mecanismos de citotoxicidad celular. En EC su función se encuentra bien preservada, de hecho se observa un aumento de estas células en todos los estadios de EC, excepto en EC refractaria de tipo II, donde tienden a desaparecer (Meresse and Cerf-Bensussan, 2009). Su aumento temprano y persistente en EC reflejaría estrés crónico del epitelio probablemente como consecuencia de la exposición a péptidos derivados de gluten. En este sentido, a partir de modelos en ratón se sabe que el enterocito produce IL-15 que genera señales de sobrevida para los LIEs (Schluns *et al.*, 2004). Trabajos recientes de nuestro grupo mostraron que CXCL10 es una quimocina crítica en el reclutamiento de LIEs (Bondar *et al.*, 2014). Sin embargo, en humanos, no ha sido claramente demostrada la función citotóxica de los LIEs sobre los enterocitos.

Además de los linfocitos T γ/δ , se encuentran linfocitos T CD8⁺ α/β que en EC activa se expanden considerablemente, producen IFN γ (Meresse *et al.*, 2012; Olausson *et al.*, 2002) y perforinas y granzimas (Di Sabatino *et al.*, 2006; Oberhuber *et al.*, 1996). Debido a que todos los cambios revierten con la dieta libre de gluten, se supone que los linfocitos T CD8⁺ pueden ser activados por presentación cruzada con péptidos de gliadinas (**Figura 13**). Gianfrani *et al.* identificaron un péptido 123-132 de α -gliadina (QLIPCMDVVL), que puede ser reconocido por linfocitos T CD8⁺ aislados de mucosa de pacientes con EC, en el contexto de HLA-A*0201. Dicho péptido estimula la producción *in vitro* de IFN γ y la citotoxicidad contra la línea epitelial intestinal Caco-2 (Mazzarella *et al.*, 2008). Los linfocitos T CD8⁺ podrían ser activados también por IL-15 y por receptores NK que interactuarían con sus ligandos en células epiteliales. Los linfocitos T CD8⁺ expresan varios receptores NK, en especial CD94 y NKG2D. Ambos receptores están sobreexpresados en linfocitos T en EC activa (**Figura 13**) (Jabri *et al.*, 2000; Meresse *et al.*, 2004). La interacción de CD94 con NKG2A genera señales inhibitorias. Se observó que NKG2A está disminuido en EC activa, por lo que CD94 se asociaría con NKG2C, que recluta el adaptador DAP12 y traduce señales estimuladoras (Meresse *et al.*, 2006). En concordancia con lo anterior, linfocitos T CD8⁺ extraídos de mucosa intestinal con EC activa inducen muerte celular en células que expresan MICA y HLA-E, ambos ligandos de NKG2D y CD94-NKG2C respectivamente. MICA y HLA-E se encuentran sobreexpresados en EC activa e *in vivo*, serían los blancos del ataque citotóxico (Meresse *et al.*, 2004; Meresse *et al.*, 2006). Mientras que la activación de los heterodímeros CD94-NKG2C sería suficiente para estimular la producción de IFN γ y la citotoxicidad, NKG2D podría funcionar como una

señal accesoria o directa para el TcR. En este sentido, parece que la expresión de IL-15 junto con NKG2D disminuiría el umbral de respuesta necesario para activar el TcR (Hüe *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2001). Estudios hechos en ratón mostraron la actividad del receptor NKG2D en la progresión hacia autoinmunidad. Se ha encontrado expresión de NKG2D en linfocitos T CD8⁺ autorreactivos en el páncreas en un modelo de diabetes mellitus tipo 1. En el mismo modelo se encontró que el ligando RAE-1 (homólogo de MICA/B) también estaba sobreexpresado en los islotes (Ogasawara *et al.*, 2004). En otro modelo similar, se observó que la expresión transgénica de RAE1 ϵ en células β del islote pancreático produce reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ (Markiewicz *et al.*, 2012). Estas observaciones sugieren que, en EC la activación crónica de los receptores tipo NK en linfocitos T CD8⁺ podría favorecer procesos de autorreactividad en intestino y en sitios extraintestinales (**Figura 13**).

Respuesta adaptativa a péptidos derivados de gluten

Considerando que fragmentos de gran tamaño derivados de gluten resisten la degradación por enzimas del tracto gastrointestinal, y que estos pueden ser trasladados en forma eficiente mediante CD71, es posible que péptidos de gluten puedan ser capturados, procesados y presentados por células dendríticas. Dichos péptidos podrían además ser deamidados por TG2 antes de ser internalizados por las células dendríticas (Jabri and Sollid, 2013). Entre los péptidos inmunogénicos, uno de los mejor caracterizados es el 33mer (56-88 α -gliadina).

Las células dendríticas en los ganglios mesentéricos inducirán activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺ que se diferencian a un perfil Th1, que luego potenciarán la respuesta de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y linfocitos B, que producirán inmunoglobulinas específicas de TG2 y péptidos derivados de gluten (**Figura 13**).

De hecho, en la fase crónica, cuando existe un alto número de linfocitos T efectores en la *lamina propria*, los eventos de activación de linfocitos T serían locales y conducirían a una abundante producción de IFN γ (Nilsen *et al.*, 1995). Existe evidencia que sugiere que IFN γ estaría involucrado en el daño directo al tejido ya que su neutralización previene los cambios morfológicos que sucederían por incubación *ex vivo* de biopsias de pacientes en DLG con gliadinas (Przemioslo *et al.*, 1995).

IFN γ puede inducir la expresión epitelial de HLA-DR, alterar la permeabilidad intestinal, y provocar daño directo de los enterocitos. En simultáneo, estos efectos pueden ser exacerbados por activación de macrófagos productores de TNF α e intermediarios reactivos del oxígeno (Scott 1997, Nilsen 1998). A su vez, nuestro grupo ha mostrado que la combinación de estas citoquinas, TNF α e IFN γ , tiene un fuerte efecto inductor de la expresión de TG2 (Bayardo *et al.*, 2012).

Los linfocitos T CD4⁺ específicos de péptidos derivados de gluten resultan fundamentales en el desarrollo de los mecanismos patogénicos en EC (**Figura 13**). Como mencionamos también determinan la aparición de los anticuerpos anti-TG2, que se desarrollan sólo en individuos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 (Sollid *et al.*, 1997; Bjorck *et al.*, 2010) y disminuyen cuando el gluten se excluye de la dieta (Dieterich *et al.*, 1998). Esta fue la primer demostración del efecto carrier-hapteno en una patología, donde los péptidos de gliadinas pueden formar estructuras unidas covalentemente con TG2 por actividad de la misma enzima, que son internalizadas por linfocitos B específicos de TG2.

Estos linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos y presentar péptidos de gliadinas en el contexto de HLA-DQ2 o DQ8. Para que finalmente linfocitos T CD4⁺ anti-gliadinas le proporcionen señales de diferenciación para producir anticuerpos anti-TG2 (Sollid *et al.*, 1997).

Los linfocitos T CD4⁺ específicos de péptidos de gliadinas también desempeñarían un papel en la remodelación tisular a través de la producción de metaloproteinasas que tienen una intensa actividad degradativa de la matriz extracelular (MacDonald *et al.*, 1999).

Es claro entonces que, en individuos genéticamente susceptibles, ciertos eventos tempranos que involucran mecanismos de la respuesta innata podrían generar señales inflamatorias exacerbadas y persistentes que determinarían la activación de la respuesta adaptativa y los mecanismos efectores de daño que conducen a la cronicidad.

Si bien tanto la inmunidad innata como la adaptativa se encuentran activas en la lesión de la mucosa intestinal, no se observan los mediadores de un mecanismo clásico de inflamación. De esta manera, EC contrasta con patologías inflamatorias intestinales tales como Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn.

En el curso de la lesión en EC activa, la respuesta innata con IL-15 e IFNs de tipo I como mediadores centrales, participaría en los eventos iniciales y probablemente en el sostenimiento de la lesión. A su vez, esto ocurre en un entorno genético de susceptibilidad que condiciona una respuesta Th1 exacerbada, una aún no bien definida participación de un perfil Th17, e inhibición de mecanismos regulatorios locales. Estos mecanismos serán descritos con mayor detalle en el capítulo 3.

Tratamiento, nuevas terapias.

En la actualidad, el único tratamiento efectivo frente a EC es la dieta estricta libre de gluten (Jabri B Sollid LM, 2009). Incluso pequeñas cantidades de gluten (50 mg/día) resultan inductoras de alteración en la mucosa duodenal de pacientes celíacos (Catassi *et al.*, 2007) Por lo tanto, todos los alimentos, e incluso los medicamentos que se administran en tratamientos prolongados, deben ser libres de gluten. Esta dieta genera cambios en los hábitos alimenticios que pueden acompañarse de efectos sobre la sociabilidad de los pacientes, ya que ciertos pacientes pueden sentirse aislados por el hecho de no poder compartir encuentros sociales donde la alimentación se basa en productos que contienen gluten. Aunque está probada la eficacia de la dieta libre de gluten en recuperar la histología intestinal y revertir el resto de las manifestaciones clínicas asociadas, existe una demanda creciente por parte de los pacientes de estrategias alternativas de tratamiento.

En los últimos tiempos, se han explorado diversas alternativas de tratamiento para EC. Entre las alternativas planteadas se encuentran (**Figura 15**) (Makharia *et al.*, 2014):

1. el desarrollo de variedades de trigo análogas a variedades ancestrales que contienen menos proteínas inmunogénicas e incluso la posibilidad de generar, por manipulación genética, variedades donde se hayan eliminado las fracciones inmunogénicas principales. Trabajos recientes han mostrado el silenciamiento post-transcripcional de genes de los tres grupos de gliadinas: ω -, γ - y α -gliadinas en el grano de trigo, utilizando RNA de interferencia (RNAi). En algunas variedades obtenidas con este método se ha logrado una disminución del contenido de secuencias tóxicas en un 98% (Gil-Humanes *et al.*, 2011).

2. el uso de proil-endopeptidasas capaces de degradar el gluten para ser ingeridas por los pacientes junto con las comidas, así se lograría la degradación de los péptidos inmunodominantes de gliadinas que resisten las proteasas intestinales.
3. el uso de polímeros que secuestran los péptidos derivados de gluten e impiden su traslocación a la *lamina propria*.
4. el uso de sustratos que regulen la permeabilidad intestinal a nivel de las uniones estrechas para prevenir la entrada de gluten a través del epitelio, como por ejemplo la disminución de la permeabilidad intestinal mediante el bloqueo del receptor epitelial ZOT utilizando antagonistas de zonulina.
5. la inhibición de la actividad de la enzima transglutaminasa 2.
6. el empleo de terapias de inmuno-modulación, que incluyen la inducción de tolerancia al gluten, el empleo de anticuerpos inhibidores de ciertas citoquinas como, por ejemplo, el empleo de anti-TNF α , anti-IFN γ , anti-IL-15, la inhibición de moléculas involucradas en el homing como CCR9 o $\alpha 4\beta 7$ que bloquearían la llegada de linfocitos T específicos a la mucosa duodenal.
7. la inhibición de la presentación de los péptidos de gluten por bloqueo de HLA-DQ2.
8. el uso de probióticos para potenciar la presencia de microorganismos con función anti-inflamatoria. En este sentido, se ha desarrollado un suplemento lácteo conteniendo un probiótico denominado ES1, con efecto antiinflamatorio demostrado en células en cultivo y en modelos animales (Sanz *et al.*, 2009).

Si bien muchas de estas alternativas todavía están en fase pre-clínica, algunos de ellos, incluidos el antagonista de zonulina y las endopeptidasas ya han alcanzado las fases II y fases III de ensayos clínicos. Estas alternativas terapéuticas han sido propuestas como complemento a la dieta libre de gluten para reducir la exigencia en situaciones sociales. Sin embargo, el consenso general sigue siendo que el único tratamiento efectivo es la dieta libre de gluten, que no puede reemplazarse por ninguna de estas terapias alternativas.

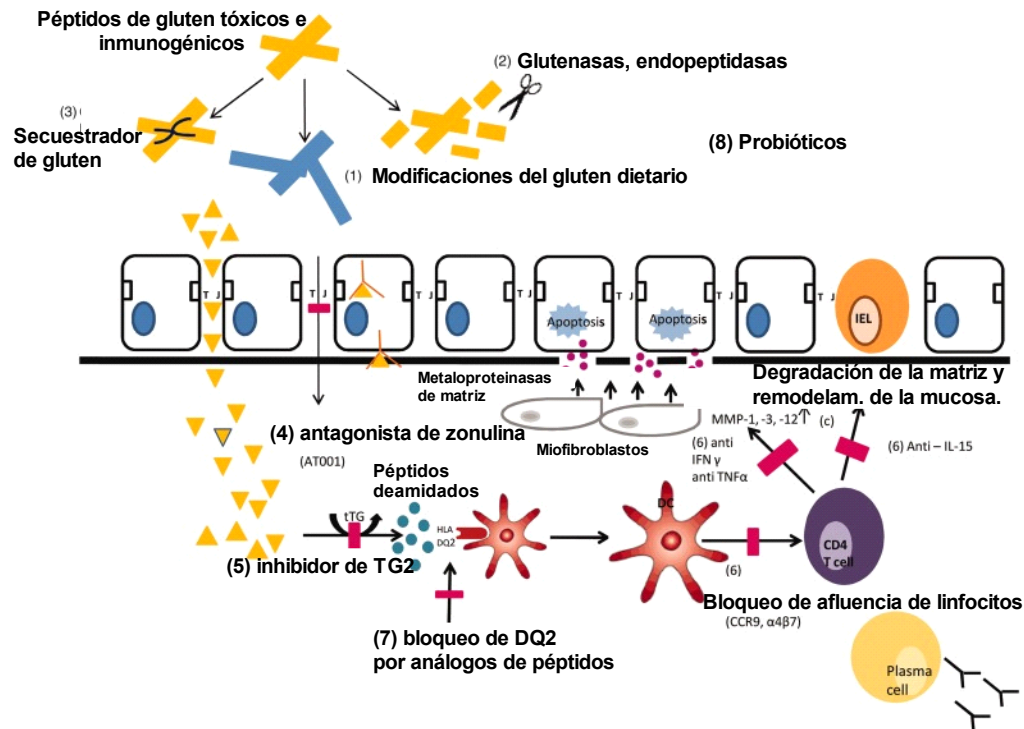


Figura 15. Esquema representativo de las terapias alternativas propuestas. Adaptado de Castillo *et al.*, 2015.

EC es un problema de Salud Pública dado que su prevalencia es muy elevada, y genera complicaciones que afectan la calidad de vida de los pacientes. Por el hecho de presentar un alto nivel de subdiagnóstico, se requieren esfuerzos para aumentar la divulgación sobre esta patología tanto en la comunidad en general como entre los profesionales de la salud, y generar además estrategias más eficientes para la detección de pacientes.

Varias etapas relevantes de la patogenia de EC aún no son conocidas. Las fases iniciales de desarrollo de los mecanismos de daño y la respuesta de la mucosa intestinal ante los mecanismos inflamatorios tempranos, son algunos de los aspectos que serán tratados en este trabajo.

Objetivos

Objetivos Generales

- Estudiar los mecanismos de patogenia de EC, los mediadores inflamatorios y de daño involucrados.
- Analizar eventos tempranos involucrados en la patogenia de EC que pertenecen a las vías innata y adquirida de inmunidad de mucosas.

Objetivos Específicos

- Analizar la expresión de las moléculas de MICA en enterocitos de mucosa intestinal humana en enfermedad celíaca.
- Analizar la expresión de las moléculas de MICA en células de los compartimentos epitelial y *lamina propria* de mucosa intestinal humana en enfermedad celíaca.
- Estudiar la expresión de MICA como indicador del estrés del tejido.
- Estudiar el rol del eje IL15/IL15R α en la patogenia de EC.
- Estudiar la distribución tisular de células dendríticas en mucosa de intestino delgado y su relación con mediadores proinflamatorios.
- Estudiar si la presencia de células iNKT en el duodeno de pacientes celíacos puede tener algún efecto en la patogénesis de EC.
- Estudiar la expresión de FoxP3 en mucosa intestinal con y sin enteropatía.

Capítulo 1. Expresión de MICA en Mucosa Duodenal.

Parte de los resultados del presente capítulo forman parte del artículo

“Broad MICA/B expression in the small bowel mucosa: a link between cellular stress and celiac disease”.

Yessica Allegretti, Constanza Bondar, Luciana Guzman, Eduardo Cueto Rua, Nestor Chopita, Mercedes Fuertes, Norberto W. Zwirner and Fernando G. Chirido. PLOS ONE. Sept. 13, 2013. doi:10.1371/journal.pone0073658.

Introducción.

Los genes de MHC de clase I no clásicos A y B, MICA/B, codifican para una familia de proteínas polimórficas relacionadas con los productos génicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (Stastny P, 2006). En el hombre, estas proteínas funcionan como señal de estrés celular. Sin embargo, a diferencia de las moléculas de MHC de clase I, su expresión no se asocia a β 2-microglobulina y son conformacionalmente estables sin necesidad de unión convencional MHC clase I – péptido (Groh *et al.*, 1996). Estas proteínas, entonces, no poseen rol en la presentación de péptidos.

Si bien las proteínas de la familia MICA/B se encuentran poco expresadas en las células en general, ciertas situaciones como shock térmico, estrés oxidativo, infección viral o transformación, logran inducir rápidamente su expresión (Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1998; Venkataraman *et al.*, 2007; Gasser *et al.*, 2005; Groh *et al.*, 2001).

MICA/B fue originalmente descrita en células epiteliales de intestino delgado (Groh *et al.*, 1996). En contraste con los genes de clase I convencionales, el promotor de MICA/B contiene elementos de regulación presentes en genes de proteínas de shock térmico, lo que resulta en su sobreexpresión bajo condiciones de estrés celular (Groh *et al.*, 1996; Venkataraman *et al.*, 2007) pero no por $\text{IFN}\gamma$, un conocido estímulo para los genes de MHC de clase I (Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1998), y una citoquina abundante en EC.

Las proteínas MICA/B son ligandos del receptor de activación NKG2D que, en el hombre, se expresa constitutivamente en todas las células NK, linfocitos $\text{T}\alpha/\beta \text{CD}8^+$, linfocitos $\text{T}\gamma/\delta$ y células NKT (Eagle *et al.*, 2007). De hecho, entre los LIEs, los linfocitos $\text{T}\gamma/\delta$ expresan NKG2D en bajos niveles, los que se pueden incrementar por incubación con IL-15 (Roberts *et al.* 2001).

NKG2D es un receptor de activación lectina de tipo C (**Figura 1**), que forma homodímeros que se asocian al adaptador transmembrana DAP10, que señala mediante activación de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y conduce, en linfocitos T, a una señal coestimuladora, mientras que en células NK parecería funcionar como receptor primario de reconocimiento capaz de activar completamente a la célula (Raulet DH, 2003).

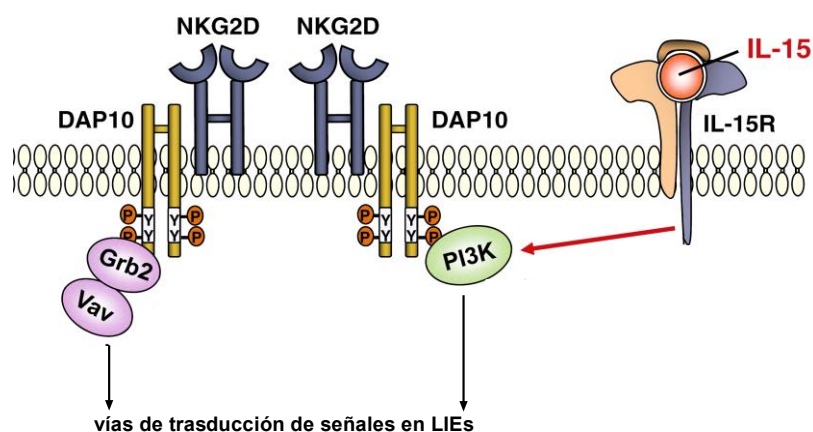


Figura 1. Esquema de la señalización vía NKG2D en linfocitos intraepiteliales (LIEs) y su interacción con la señalización vía IL-15. Adaptado de Abadie *et al.*, 2012.

A consecuencia de la interacción con su correspondiente ligando, NKG2D genera la

activación de una respuesta citotóxica, con secreción de citoquinas como IFN γ y proliferación celular. Esta citotoxicidad es independiente de la activación del TcR (Meresse *et al.*, 2004). De esta manera, la interacción MICA/NKG2D sería responsable de los sucesos celulares que llevarían, en última instancia, a la remoción de la célula dañada, infectada o transformada; sirviendo esto como uno de varios mecanismos activos de vigilancia inmunológica (Eagle *et al.*, 2009).

En particular, en nuestro campo de estudio en epitelio intestinal humano, MICA se ha descrito como señal de estrés celular y sería reconocida por LIEs capaces de activar la inducción de apoptosis en los enterocitos que la expresan. De esta manera, se ha propuesto la expresión de MICA como uno de los elementos clave de la respuesta de daño a los enterocitos en EC activa (Hue *et al.*, 2004).

Si bien, los estudios de Groh *et al.*, 1996,1998; Meresse *et al.*, 2004; Hue *et al.*, 2004, entre otros, aportaron información sobre el posible rol de MICA en EC, un aspecto clave en este modelo, la expresión de MICA en la mucosa intestinal, ha sido poco evaluada.

Hoy sabemos que existen mecanismos tanto innatos como adaptativos involucrados en la patogenia de EC y que su interacción es necesaria para el desarrollo de la patología (Maiuri *et al.*, 2003; Londei *et al.*, 2005; Stepniak *et al.*, 2006; Abadie *et al.*, 2011). La inmunidad innata contribuye a los cambios estructurales a nivel de la mucosa intestinal. Se han descrito muchos efectos biológicos y proinflamatorios para el péptido p31-43. Este péptido estimula al sistema inmune innato. No se ha identificado aún su receptor, en cambio se cree que media sus acciones alterando el tráfico celular o por activación de vías de estrés aún no definidas totalmente (Jabri y Sollid 2009). No induce respuestas T específicas en intestino pero tiene efectos sobre células epiteliales intestinales que incluyen la inducción de apoptosis (Cheroutre *et al.*, 2011), el aumento de la expresión de MICA/B (Leishman *et al.*, 2001), y la inhibición de la vía endocítica del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo que resulta en un aumento de la expresión y activación del mismo (Hayday *et al.*, 2001). Los efectos más generales sobre otras células no linfocitos T incluyen inducción de MAPKp38, CD83 e IL-15 (Cheroutre *et al.*, 2011) (**Figura 2**).

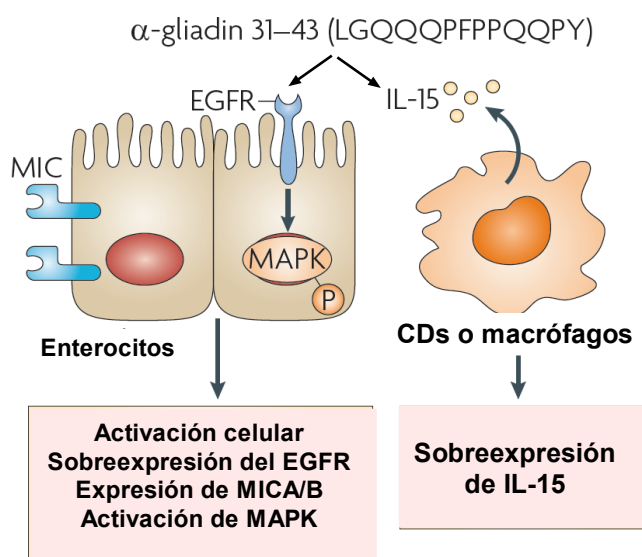


Figura 2. Efectos biológicos y proinflamatorios descritos para el péptido p31-43. Adaptado de Jabri and Sollid, 2009.

IL-15 es una citoquina crítica en los mecanismos de respuesta en la mucosa intestinal, de hecho muchos trabajos hablan de su sobreexpresión en mucosa intestinal en EC activa (Meresse *et al.*, 2004; Hue *et al.*, 2004; Maiuri *et al.*, 2000, 2003; Mention JJ *et al.*, 2003). Esta citoquina, entre otros efectos, sería responsable de la inducción de MICA en las células epiteliales intestinales (Hue *et al.*, 2004; Meresse *et al.*, 2006). También se probó que es capaz de alterar las propiedades de señalización y aumentar la actividad citotóxica de poblaciones de LIEs (Meresse *et al.*, 2004; Hue *et al.*, 2004; Di Sabatino *et al.*, 2006; Ebert EC, 2005).

Consecuentemente, la expresión en superficie de MICA ha sido postulada como señal de muerte de enterocitos por interacción vía NKG2D con LIEs en un entorno rico en IL-15 (Sollid LM, 2004). Además, los niveles aumentados de MICA en EC activa retornan a valores normales bajo una dieta estricta libre de gluten, subrayando así la importancia de las señales derivadas de péptidos de gliadinas en la inducción directa o indirecta de la expresión de MICA.

De esta manera, los péptidos derivados de gluten serían capaces de generar una respuesta inmune innata que actúa en conjunto con la respuesta adaptativa. La respuesta innata, menos explorada en EC, sería responsable de contribuir a los cambios morfológicos típicos de la lesión celíaca.

Los estudios de Meresse *et al.*, y Hue *et al.*, de 2004, establecieron un modelo de trabajo donde la interacción MICA/NKG2D tendría un rol importante en el desarrollo de la lesión en la mucosa intestinal. De esta manera, MICA se presenta como un ligando clave que actuaría como disparador del daño epitelial mediado por IL-15. MICA tendría además un rol en la homeostasis de la mucosa como indicador de enterocitos dañados que deben ser eliminados. Este rol postulado para MICA de preservar la integridad del epitelio intestinal, eliminando células epiteliales dañadas/estresadas sería fundamental en el control de la homeostasis e inflamación en intestino. Sin embargo, se plantean ciertos interrogantes al no contar con una caracterización más extensiva de la expresión de MICA en diversas células presentes en duodeno. ¿Estaría la expresión de MICA únicamente restringida a enterocitos que van a ser blanco de LIEs programados para matar?, ¿Sería ese su único rol en mucosa intestinal humana? ¿Podría MICA formar parte de algún otro mecanismo fisiológico de recambio celular en tejido?

Con el fin de analizar estas preguntas, se estudió la expresión tisular de MICA/B en pacientes celíacos con diferentes grados de lesión, pacientes en dieta libre de gluten y controles no celíacos. Nuestra intención fue describir con más detalle lo observado en epitelio intestinal humano y analizar otras posibles fuentes de MICA/B en mucosa intestinal. Para este trabajo se utilizaron biopsias intestinales de pacientes pediátricos.

Objetivos

- Estudiar la expresión de MICA en enterocito en EC y en controles no celíacos.
- Estudiar la expresión de MICA en células del compartimento epitelial no enterocitos.
- Estudiar la expresión de MICA en células de la *lamina propria*.

Resultados

Expresión de MICA/B en intestino delgado.

Se ha descrito que las moléculas MICA tienen un rol crítico como ligandos de receptores de activación de citotoxicidad (NKG2D) presentes en linfocitos intraepiteliales. De esta manera, MICA marca aquellos enterocitos que sufrirán muerte celular. Si bien este es un modelo de trabajo que permite interpretar parte de los cambios producidos en el epitelio en EC activa, un aspecto clave en este modelo, la expresión de MICA en la mucosa intestinal, no ha sido profundamente evaluado. Por este motivo, el primer objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar, por inmunohistoquímica (IHQ), la expresión de MICA/B sobre cortes histológicos de biopsia duodenal de pacientes pediátricos correspondientes a distintos grados de lesión histológica.

Se estudiaron pacientes pediátricos con el interés de evaluar los cambios más tempranos evidenciables en la patología. Las muestras se agruparon en pacientes controles y pacientes celíacos con enteropatías leve, moderada y severa. Los controles no celíacos cuentan con serología negativa y biopsia con histología conservada. El estudio de expresión se realizó empleando el anticuerpo monoclonal murino D7 (IgG2b) que reconoce MICA y presenta una reactividad cruzada de menos del 10% para MICB, producido por el grupo de trabajo del Dr. N. Zwirner (IBYME, UBA). Por simplicidad a lo largo del presente estudio citaremos al anticuerpo como D7 o anti-MICA. Como anticuerpo control de isotipo se empleó un anticuerpo IgG2b comercial (Ansell).

Se realizaron ensayos para la optimización de la IHQ. En la **Figura 3**, se muestra el resultado de la marcación con el anticuerpo D7 y con el control de isotipo, en una enteropatía severa en un paciente pediátrico. Se observa una intensa tinción específica de MICA en el epitelio así como en *lámina propia*. El anticuerpo D7 ha sido extensamente estudiado pero no había sido empleado para analizar la expresión de MICA en intestino.

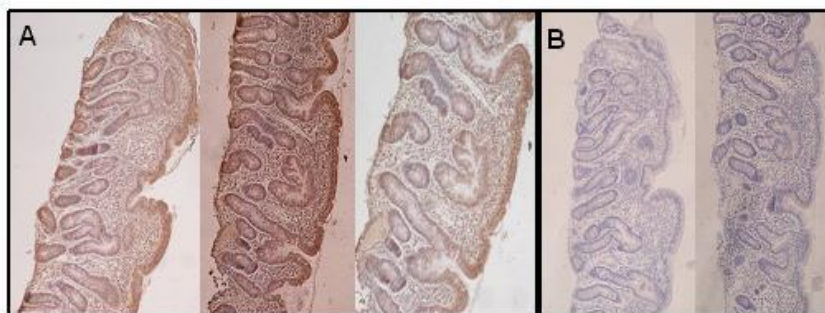


Figura 3. Análisis de MICA por IHQ. Imágenes representativas del análisis de expresión de MICA por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo D7 (A), y su control de isotipo IgG_{2b} (B) sobre cortes de biopsias de mucosa duodenal con enteropatía severa.

Una primera evaluación de las marcaciones en IHQ sobre un panel de muestras de controles y de pacientes celíacos con diferentes grados de lesión histológica evidenció una intensidad de tinción diferente entre controles y celíacos. Como ejemplo, en la **Figura 4** se muestran IHQ representativas de la marcación obtenida en tejidos con distintos grados de alteración histológica. En términos generales se observó un incremento en la intensidad de tinción cuando las muestras correspondían a lesiones más severas. Sin embargo, en forma llamativa, aunque la muestra E presenta atrofia total, a diferencia de lo esperado, no presentó marca intensa para MICA.

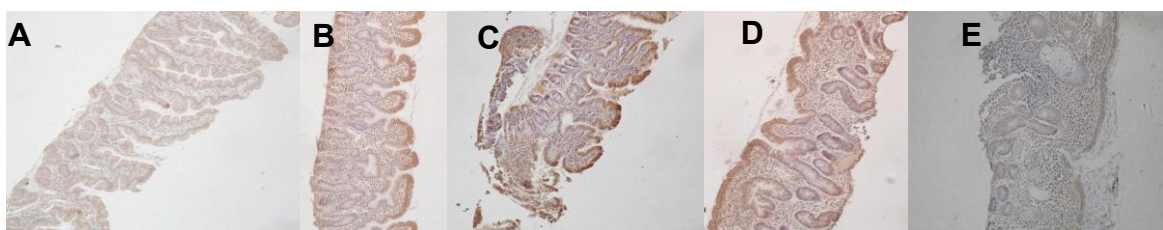


Figura 4. La expresión de MICA en mucosa intestinal varía de acuerdo al tipo de lesión histológica. Inmunohistoquímica empleando el anticuerpo D7 representativa de los diferentes tipos de lesión analizados en cortes de biopsia intestinal de distintos pacientes. **A.** Control no celíaco. Pacientes con EC al diagnóstico: **B.** Enteropatía leve. **C.** Enteropatía moderada. **D.** Enteropatía severa. **E.** Enteropatía severa (Magnificación 20x).

Dadas las diferencias de tinción observadas, se estableció un score arbitrario de intensidad de marca en el epitelio con el fin de realizar un análisis comparativo. El score arbitrario fue definido desde cero hasta cuatro, asignando el valor cero al control de isotipo. De esta manera, al analizar los resultados de IHQ correspondientes a muestras de 27 pacientes pediátricos, observamos que las muestras control mostraron un muy bajo grado de marcación en el epitelio, mientras que las enteropatías moderadas y severas presentaron la marcación más intensa. En la **Figura 5**, se muestra la distribución de los valores de score en relación a la estadificación de la lesión. Aunque observamos cierta variabilidad entre los resultados de un mismo grupo, se encontró correlación entre el grado de lesión y la intensidad de la marcación observada. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas entre el grupo control y las enteropatías moderadas y severas. Llamativamente en 2 de 9 atrofias se alcanzaron niveles de marcación correspondientes a un score de 1.

En la mayoría de las enteropatías analizadas se observó un patrón discontinuo de marcación a lo largo del epitelio. Se evidenciaron zonas muy intensamente marcadas, que generalmente corresponden a las puntas de vellosidad (**Figura 6**).

El análisis por IHQ también permitió observar células MICA/B⁺ en *lamina propria* y en el compartimento intraepitelial, que serán estudiadas en detalle más adelante.

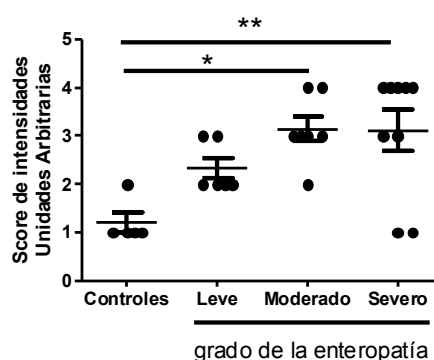


Figura 5. La expresión de MICA/B en mucosa intestinal en EC incrementa con el grado de lesión histológica. Marcación de MICA/B por inmunohistoquímica sobre biopsias duodenales de veintisiete (27) pacientes pediátricos divididos en cuatro grupos de acuerdo a la alteración histológica de la mucosa. Los resultados se refieren a un score arbitrario de intensidades de marca. El control de isotipo se define como score cero. Se grafica el score arbitrario de intensidades de marca alcanzado Vs. el número de pacientes en cada condición (n). Cada punto corresponde al score obtenido por cada muestra analizada. Análisis estadístico de los datos mediante el test de Kruskal Wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns (* $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$).

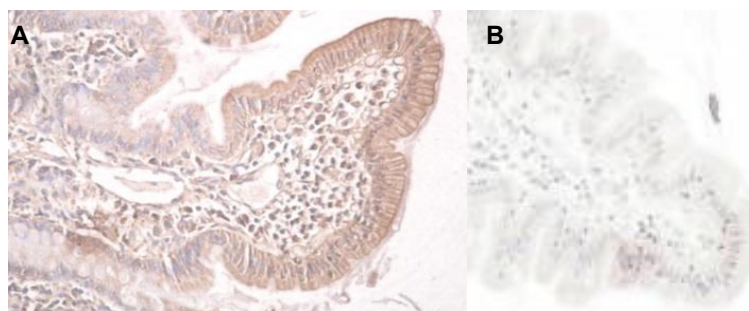


Figura 6. El grado de expresión de MICA/B varía a lo largo del epitelio duodenal. Se observa un patrón discontinuo de expresión siendo la punta de vellosidad la zona más intensamente marcada. A: inmunohistoquímica representativa, paciente con enteropatía moderada en el que se observa variación de la intensidad de coloración marrón a lo largo de la línea epitelial, B: control de isotipo. (Magnificación 40x).

Niveles de RNAm de MICA en intestino delgado

Habiendo observado por IHQ un aumento en la expresión de MICA asociado a la enteropatía, decidimos evaluar si existían evidencias de inducción de MICA por estudios de PCR cuantitativa (qPCR) en piezas de biopsia entera de pacientes celíacos al diagnóstico. Se midieron los niveles de RNAm para MICA por RT-qPCR usando β -actina como housekeeping gene, en piezas de biopsia duodenal entera de 15 controles no celíacos y 18 pacientes celíacos al diagnóstico. Los resultados obtenidos mostraron mayores niveles de RNAm de MICA en EC activa con respecto a los controles, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 7**).

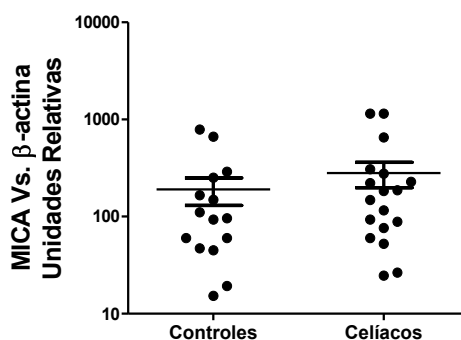


Figura 7. Niveles de RNAm de MICA en mucosa intestinal. Los niveles de expresión de MICA relativos a β -actina se midieron por RT-qPCR en muestras de biopsia duodenal entera de 15 controles no celíacos y 18 celíacos activos. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos analizados, Mann Whitney test.

Cambios en la expresión de MICA con la ingesta de gluten

Con el fin de evaluar si la expresión de MICA era consecuencia directa de la ingesta de gluten, estudiamos muestras de pacientes celíacos al diagnóstico y luego de un largo período (como mínimo dos años) en dieta libre de gluten. En la **Figura 8**, se muestra un ejemplo representativo de los casos evaluados, donde se observa una sustancial reducción de la expresión de MICA. La dieta libre de gluten normaliza los niveles de expresión de MICA.

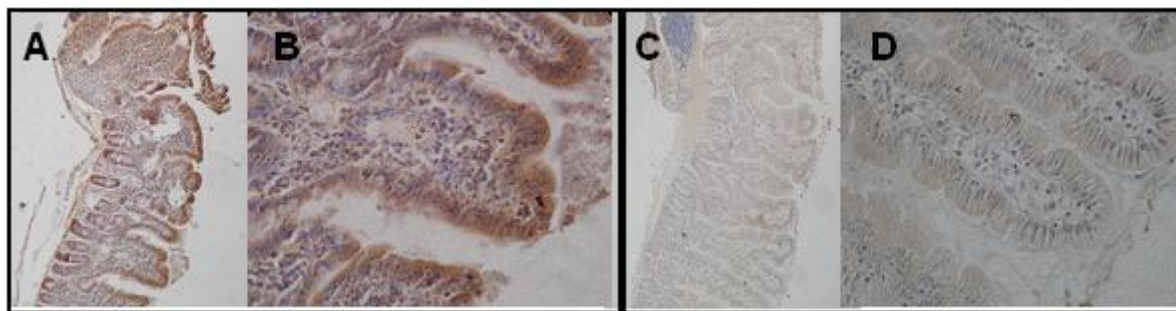


Figura 8. La dieta libre de gluten normaliza la expresión de MICA. Inmunohistoquímica que muestra expresión de MICA en un paciente con EC activa (A y B) y el mismo luego de dos años de dieta libre de gluten (C y D). Los cortes fueron marcados en simultáneo sobre la misma gota de reactivos a lo largo de todo el procedimiento de marcación). (Magnificación, A y C: 20x, B y D: 40x).

Análisis de expresión de MICA en intestino delgado por inmunofluorescencia.

Los estudios anteriores por IHQ permitieron establecer que existen diferencias claras de expresión entre muestras con distinta alteración histológica, que el patrón de expresión es discontinuo a lo largo del epitelio y que existen células que expresan MICA en *lamina propria*. Con el objetivo de lograr una mejor caracterización de la expresión de MICA en la mucosa, empleamos técnicas de microscopía que permiten un análisis más detallado como la microscopía de fluorescencia convencional y en especial la microscopía confocal.

El análisis de expresión de MICA en secciones de biopsias duodenales de pacientes al diagnóstico y luego de dos años de dieta libre de gluten mediante microscopía de fluorescencia, mostró claramente la reducción considerable de la marcación con el cumplimiento de la dieta libre de gluten (**Figura 9**).

De manera relevante este estudio permitió observar, por primera vez, que MICA se encontraba mayoritariamente en forma intracelular y no en membrana. A su vez, que el patrón de marcación asociado a MICA era similar tanto en muestras de pacientes celíacos al diagnóstico como en individuos en dieta libre de gluten aunque presentaba menor intensidad en los últimos, pero que difería del observado en tejidos control. En pacientes celíacos con EC activa o en dieta libre de gluten, MICA se encontraba en densos gránulos en forma perinuclear, tal vez asociada al sistema de membranas de la célula. Mientras que en duodeno de individuos control, la distribución de la marca en enterocitos se presentaba de forma intracelular pero sin formar grandes agregados (**Figura 9**).

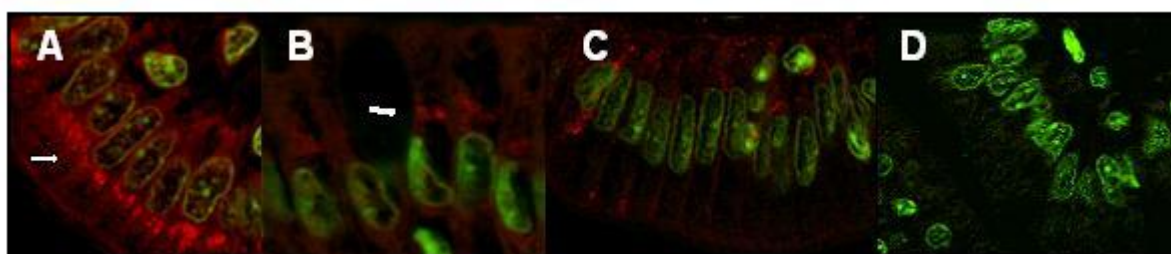


Figura 9. Localización intracelular de MICA en epitelio intestinal. Análisis de expresión de MICA en cortes de biopsias de duodeno por inmunofluorescencia en: (A) Enteropatía moderada de un paciente de 18 meses de edad al diagnóstico (scan zoom 4,0) y (B) luego de 2 años de dieta libre (scan zoom 4,1). (C) Paciente control. (D) control de isotipo. MICA (rojo) núcleos (Syto 13 verde). (Magnificación 63x).

Expresión de MICA en epitelio y en células de lamina propia.

Considerando la mayor resolución obtenida en el análisis por microscopía de fluorescencia, se evaluaron muestras con enteropatía severa que presentaron alto (4) y bajo (1) score por inmunohistoquímica (**Figura 10**). Si bien se observa la presencia de células MICA⁺ en todos los casos, la diferencia entre los distintos scores resultó ser debida al número de células positivas encontradas en cada caso, en especial en *lamina propria*. En los pacientes celíacos con atrofia vellositaria y alto score evidenciamos presencia de un importante infiltrado en lámina propia con más de un tipo celular expresando MICA. A su vez, estos pacientes mostraron un importante infiltrado intraepitelial. Por otro lado, aquellos pacientes con atrofia vellositaria y bajo score de marcación por IHQ mostraron expresión de MICA en epitelio de vellosidades, y en algunos casos también en criptas pero, a diferencia, no presentaron importante infiltrado celular ni en *lamina propria* ni en el compartimiento intraepitelial. Por lo tanto, el score observado en IHQ es una ponderación estimada de la expresión de MICA en toda la mucosa y no solo en el epitelio. De esta forma, hemos observado que el patrón de expresión de MICA es principalmente intracelular y se encuentra en enterocitos como así también en células del infiltrado de *lamina propria* y del compartimiento intraepitelial.

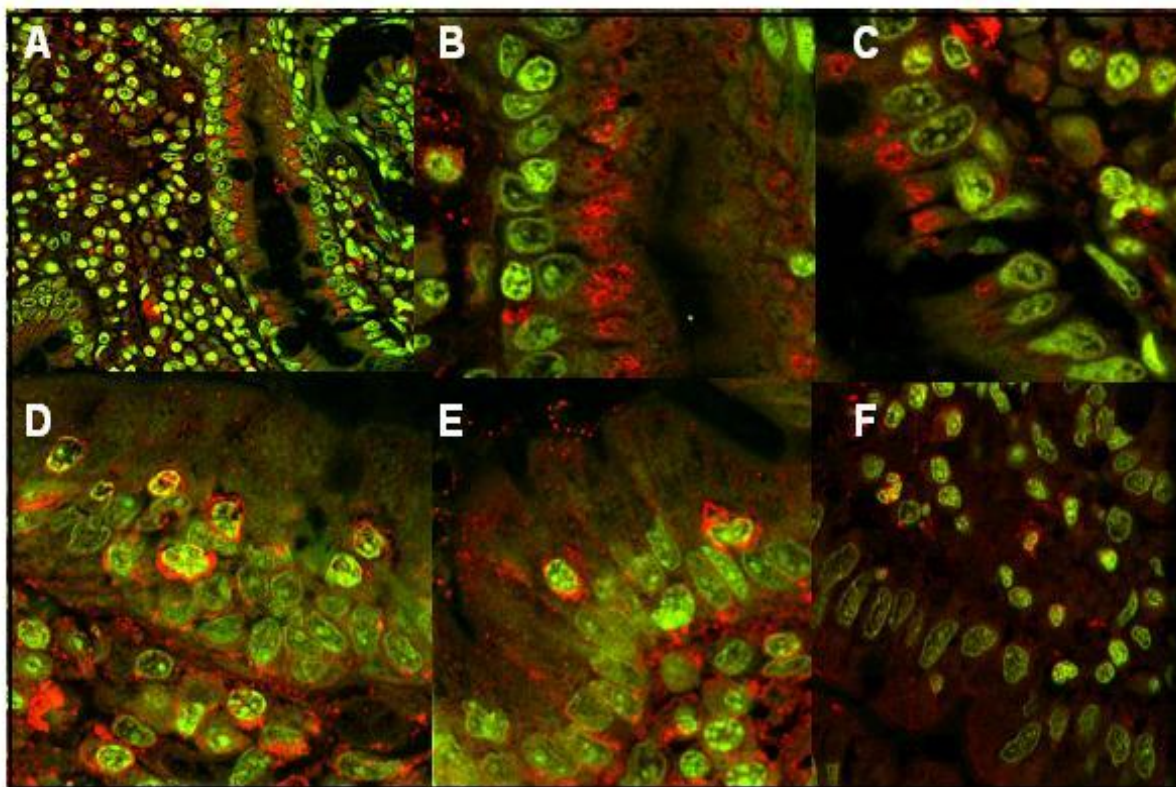


Figura 10. Expresión intracelular de MICA en epitelio y en células de *lamina propria* y del compartimiento intraepitelial. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de MICA (rojo) en secciones de biopsias duodenales con enteropatía severa de bajo score en IHQ (**A, B,C**) y con alto score (**D y E**). **F**: paciente control. núcleos (Syto 13, verde). (Magnificación A: 40x B,C,D,E, y F: 63x, scan zoom B,C,D,E: 2,5; F: 2).

Caracterización de las células MICA positivas en la mucosa de intestino delgado.

Con el fin de identificar las células que expresan MICA en la mucosa intestinal, y caracterizar el patrón de expresión, se empleó una técnica de mayor resolución como lo es la microscopía confocal de fluorescencia.

Expresión de MICA en enterocitos.

Con el objetivo de caracterizar el patrón de expresión de MICA en enterocitos se evaluaron muestras de 7 controles no celíacos, 8 enteropatías leves, 10 enteropatías moderadas y 9 enteropatías severas mediante microscopía confocal de fluorescencia. En todos los casos, con diferencias de intensidad, se observó expresión intracelular de MICA (**Figura 11**). En tejidos con enteropatías leves y moderadas encontramos que la marca se distribuye formando grandes agregados en la región perinuclear de enterocitos, comúnmente orientados hacia el polo apical de la célula (**Figura 11, A y B**). El patrón de expresión encontrado en enteropatías severas fue similar, aunque la arquitectura de la mucosa atrófica y el infiltrado linfocitario de este tipo de muestras hizo más dificultosa la interpretación de la marcación. Las muestras de pacientes control mostraron también marcación positiva para MICA en el citoplasma de enterocitos, pero la intensidad de expresión fue mucho menor que lo hallado en los demás grupos. En este último grupo el patrón no presentó grandes agregados, sino que resultó difuso.

En todos los casos analizados la marcación para MICA resultó llamativamente más intensa en células mononucleares (tanto del compartimento intraepitelial como de *lamina propria*) que lo observado en enterocitos. En algunos casos las imágenes mostraron que las células MICA⁺ no epiteliales eran claramente identificables aún en ausencia de marcación detectable en enterocitos. Estas células MICA⁺ halladas resultaron de diversa morfología y diferente patrón de expresión.

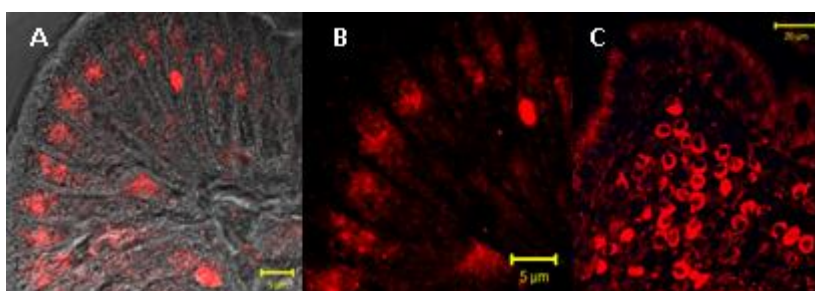


Figura 11. Expresión intracelular de MICA en enterocitos en EC activa. Muestras representativas de secciones de biopsias duodenales de celíacos con enteropatía leve (**A y B**) y moderada (**C**) (MICA en rojo) (Magnificación: 63x, scan zoom 2,6 A y B; 0,7 C).

Expresión de MICA en células aisladas de epitelio intestinal humano

Con el objetivo de lograr una caracterización adicional a los estudios por microscopía confocal en cortes de biopsias duodenales de pacientes controles y celíacos, estudiamos mediante citometría de flujo la expresión de MICA en células aisladas del compartimento epitelial.

Evaluamos la expresión de MICA en células CD3⁻ (mayoritariamente enterocitos) obtenidas por tratamiento de la pieza de biopsia con solución de EDTA. El análisis por citometría de flujo mostró que la expresión de MICA es fundamentalmente intracelular, encontrando además cierta expresión en superficie (**Figura 12A**). De manera similar, un análisis comparativo utilizando piezas de biopsias duodenales de pacientes controles y celíacos adultos sometidas a tratamiento con EDTA mostró que la población de enterocitos, definida por características de tamaño y granularidad, presenta mayoritariamente expresión intracelular de MICA. Si bien se analizó un escaso número de pacientes, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de MICA entre controles y celíacos (**Figura 12B**).

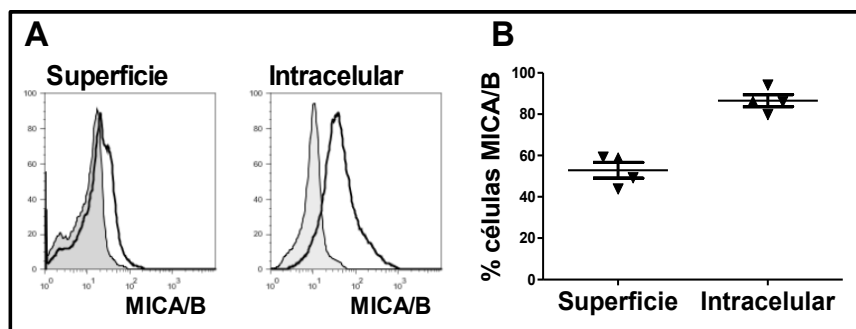


Figura 12. Expresión de MICA en células del epitelio intestinal. **A.** Análisis por citometría de flujo de la densidad de expresión de MICA en células CD3⁺ pertenecientes a la fracción epitelial de biopsia duodenal de paciente control pediátrico en relación al control de isotipo (histograma lleno). **B.** Análisis por citometría de flujo del % de células MICA positivas seleccionadas por características físicas (tamaño y granulometría) compatibles con enterocitos de biopsias duodenales de pacientes adultos controles (▼) y celíacos (▲).

Expresión de MICA en el compartimento intraepitelial.

Con el objetivo de identificar las células MICA⁺ en la mucosa de intestino delgado diferentes a los enterocitos se analizó por microscopía confocal de fluorescencia la expresión de MICA en células de distintos linajes. Se utilizaron anticuerpos específicos de linajes o subpoblaciones para evidenciar los diferentes tipos celulares. Sin embargo, el panel de anticuerpos disponible es reducido ya que son limitados los anticuerpos que permiten el reconocimiento de antígenos en tejido incluido en parafina que fue previamente fijado en formaldehído. En el caso del compartimento intraepitelial, se analizó la presencia de células NK (CD57⁺) y linfocitos T CD3⁺.

En la **Figura 13A** se observa la expresión de células CD57⁺ en mucosa intestinal en los diferentes grupos de pacientes analizados. Las células CD57⁺ se visualizan con citoplasma en verde y asociadas fundamentalmente al intraepitelial. Tanto en controles como en pacientes con enteropatía se observó un escaso número de células CD57⁺ en mucosa. El análisis de la expresión de MICA en estas células se realizó mediante microscopía de fluorescencia y con análisis confocal (**Figura 13B**). El hallazgo de células CD57⁺ con expresión de MICA fue aun más raro, encontrándose las fundamentalmente asociadas a mucosas atroficas.

Para realizar un estudio cuantitativo se analizaron secciones de biopsias duodenales de 11 controles no celíacos y 8 enfermos celíacos al diagnóstico. En cada muestra, se analizaron tres unidades de *muscularis mucosae* (m.m.). Los resultados obtenidos indican que este tipo celular no es frecuente en mucosa celíaca ni en muestras controles, tal como lo observamos en la **Figura 13A**; aunque se pudieron evidenciar algunas células NK que expresan MICA. Se observó un aumento en el porcentaje de células NK que expresan MICA en pacientes celíacos, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 14**).

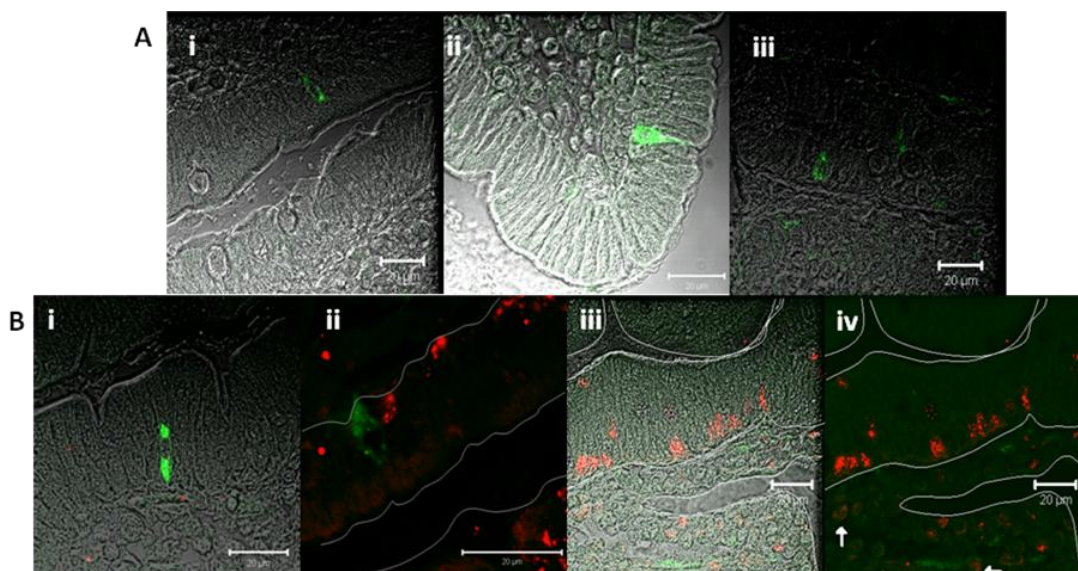


Figura 13. Expresión de MICA en células CD57⁺ de la mucosa intestinal. **A.** Análisis por microscopía de fluorescencia de la expresión de células CD57⁺ en mucosa duodenal: las células CD57⁺ se observan con citoplasma en verde, (i) control, (ii) enteropatía leve, (iii) enteropatía severa. Magnificación 100x scan zoom 0,7. **B.** Análisis por microscopía de fluorescencia y confocal de la expresión de MICA en células NK en secciones de biopsias duodenales de pacientes control y celíacos. Se observan células CD57⁺ (verde) y la expresión de MICA (rojo). El borde del epitelio fue dibujado durante la adquisición respetando la ultraestructura del corte para mejor visualización del resultado (Magnificación 100x). (i) control, scan zoom:1 (ii) Enteropatía leve, scan zoom 1.7 (iii y iv) enteropatía severa, scan zoom 0.7. Las flechas indican células dobles positivas.

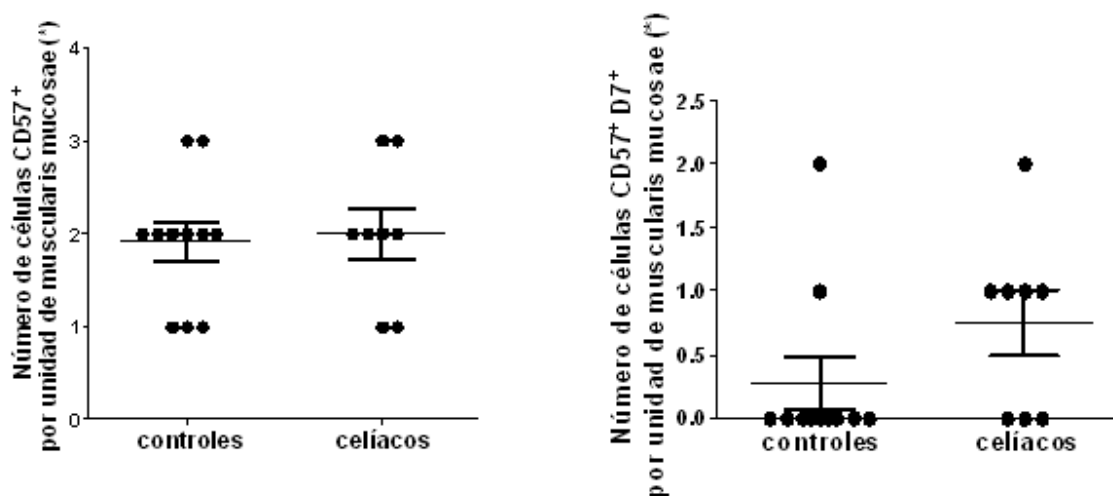


Figura 14. Células NK (CD57⁺) que expresan MICA en intestino delgado. Se realizaron los recuentos de células CD57⁺ (panel izquierdo) y células CD57⁺MICA/B⁺ (panel derecho) en epitelio intestinal de controles no celíacos (n=11) y de celíacos al diagnóstico (n=8). (*): Una unidad m.m. corresponde a un área que contiene 6 criptas. Los valores son los promedios generales en el total de muestras analizadas. (No se observó diferencia significativa, Test de Mann Whitney).

Con el objetivo de analizar la población de linfocitos T se utilizó un anticuerpo policlonal anti-CD3 comercial tanto en cortes por congelación como en muestras incluídas en parafina. Si bien en estas marcaciones se observaron células CD3⁺ MICA/B⁺ en el compartimento intraepitelial, la calidad de las imágenes no permitió el recuento diferencial.

Utilizamos entonces, CD7, otro marcador de linfocitos T para estudiar el compartimiento intraepitelial. En este caso, las imágenes obtenidas fueron de alta calidad y permitieron observar que la mayoría de las células MICA/B⁺ corresponden a células CD7⁺ (**Figura 15A**). Las células CD7⁺ sujetas a la marcación presentaron citoplasma verde y se encontraron distribuidas tanto en el

compartimento intraepitelial como en la *lamina propria* (Figura 13A). En general se las halló dispersas en la mucosa aunque en algunos casos se observaron formando pequeños grupos en *lamina propria*. En las células CD7⁺ la expresión de MICA/B fue claramente intracelular y polarizada hacia un extremo. El análisis cuantitativo de células CD7⁺MICA⁺ en el compartimento intraepitelial mostró un significativo aumento en enteropatías leves y moderadas (Figura 15B). El porcentaje de células dobles positivas en estos pacientes por unidad de *muscularis mucosae* fue el más alto encontrado dentro de todos los grupos analizados (15.6%). De manera muy clara, en el grupo control, la mayoría de las células CD7⁺ resultaron MICA negativas. En las muestras de enteropatía leve y moderada, el total de células MICA⁺ CD7⁺ resultó 2.3 veces mayor que en controles. Sorpresivamente en enteropatías severas encontramos los menores porcentajes de células CD7⁺MICA⁺ (2%). En forma característica, el número de células CD7⁺ en el compartimento intraepitelial fue muy superior en enteropatía severa, siendo dos veces mayor a lo encontrado en enteropatías leves o en tejido normal. Sin embargo, el número total de células MICA⁺CD7⁺ en enteropatías severa fue el menor para todo los grupos estudiados incluyendo el tejido normal.

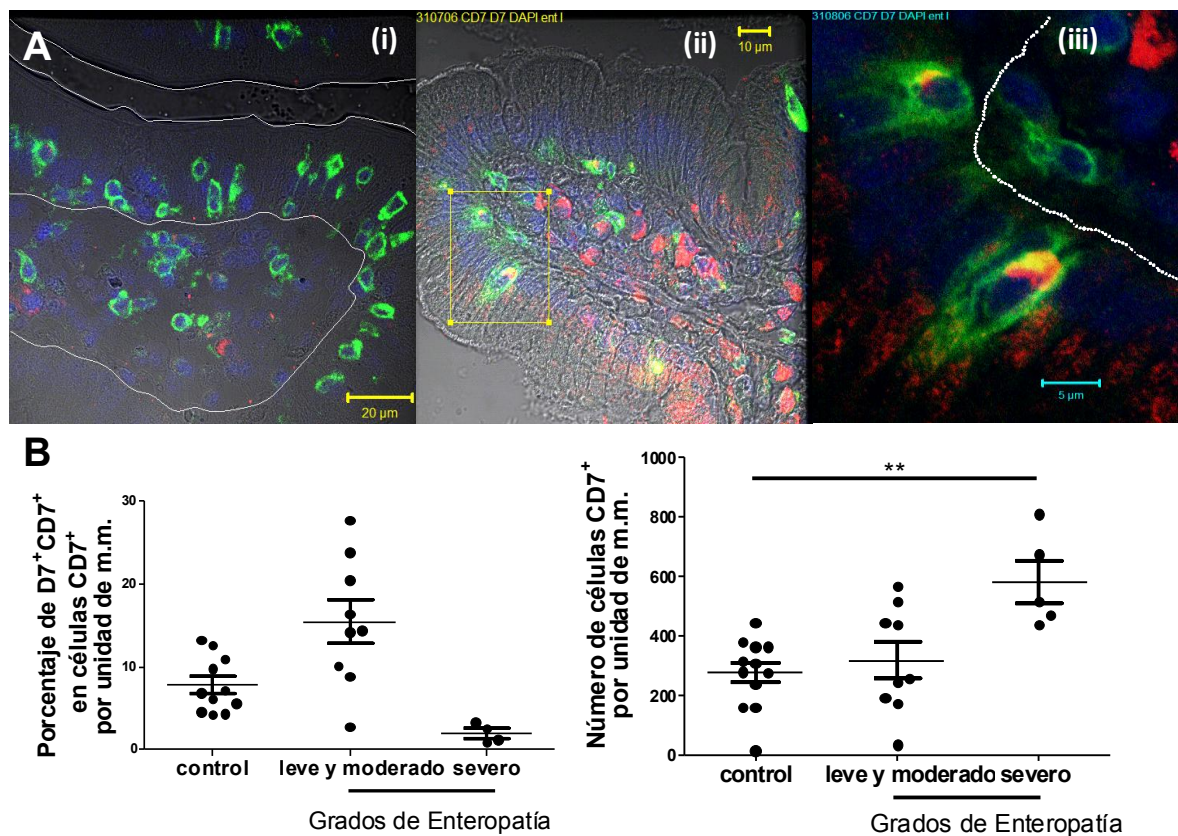


Figura 15. Expresión de MICA en células CD7⁺ en el compartimento Intraepitelial. A.- Análisis de la expresión de MICA en células CD7⁺ por microscopía confocal de fluorescencia sobre secciones de biopsias duodenales. CD7 (verde), MICA (rojo) y núcleos (azul). (i) Imagen representativa de una sección de biopsia duodenal en un control no celiaco (ii) imagen representativa de una sección de biopsia duodenal en enteropatía leve (iii) Sección aumentada de (ii), mostrando células CD7⁺MICA/B⁺ del compartimento intraepitelial. Los compartimentos intraepitelial y *lamina propria* fueron delimitados en la figura con una línea respetando el contorno del tejido. (Magnificación 100x). B.- El número de células CD7⁺MICA/B⁺ fue determinado por unidad de *muscularis mucosae* (m.m.) utilizando microscopia de fluorescencia en secciones de duodeno de 11 controles no celiacos, 9 pacientes con enteropatía leve y 4 pacientes con enteropatía severa. Se muestran el porcentaje de células CD7⁺MICA⁺ en el total de células CD7⁺ (panel izquierdo) y el número total de células CD7⁺ (panel derecho). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns ** p ≤0.01.

Expresión de MICA/B en la lámina propia.

El infiltrado linfocitario en mucosa intestinal es una de las características histológicas distintivas observables en EC sin tratamiento. Particularmente, hallamos un importante aumento en el número total de células $CD3^+$ en *lamina propria* en los tejidos con enteropatía comparados con los controles. Sin embargo, el anticuerpo policlonal anti- $CD3$ usado no permitió una imagen lo suficientemente clara como para lograr un recuento confiable en zonas donde las células se encontraban agrupadas (**Figura 16**). En muestras con enteropatía severa, una subpoblación de estas células $CD3^+$ expresó MICA (**figura 17i**).

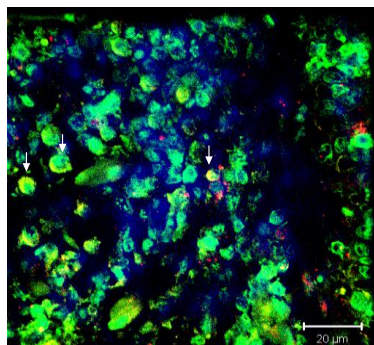


Figura 16. Expresión de MICA en linfocitos $CD3^+$. Microscopía confocal de fluorescencia donde se observa la *lamina propria* de tejido con enteropatía severa y marcación para $CD3$ en verde y MICA en rojo, la colocalización representativa se indica con una flecha blanca y se observa en amarillo. Magnificación 40x.

Al igual que para el compartimento intraepitelial, estudiamos el marcador $CD7$ para evaluar las imágenes de fluorescencia y caracterizar a la población de linfocitos T. Las células $CD7^+$ se encontraron aisladas o en pequeños grupos en la *lamina propria* en muestras de duodeno de individuos celíacos y no celíacos. Un grupo de estas células $CD7^+$ expresan MICA (**Figura 17, ii e iii**). Las células $MICA^+$ resultaron el 2,6% en controles, el 1,9% en enteropatías severas y el 7,6% en enteropatías leves y moderadas del total de células $CD7^+$. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre controles y muestras con distinto grado de enteropatía (**Figura 18**), el porcentaje promedio observado de $MICA^+CD7^+$ fue mayor en enteropatías leves y moderadas. En enteropatías severas el número de células $CD7^+$ resultó significativamente aumentado comparado con los otros grupos. Por esta razón, se observa un aumento al doble de las células $MICA^+CD7^+$ en enteropatías comparado con el grupo control. Mientras que en el caso de enteropatías severas se observa un incremento en la celularidad en gran parte debido a células $CD7^+$ (**Figura 18**).

Hemos analizado también la expresión de MICA en células de linaje B en *lamina propria* utilizando los marcadores de linfocito B ($CD20$) y de célula plasmática ($CD138$). Las células $CD20^+$ se observaron con distribución aislada o en agregados a lo largo de la *lamina propria* tanto en controles como en pacientes celíacos. En todos los casos observamos células $CD20^+MICA^+$ siendo las mismas más frecuentes en los agregados $CD20^+$ (**figura 17 iv**). En la mayoría de los casos la expresión de MICA colocalizó con $CD20$ que se expresa asociado a la membrana celular. En el análisis de células plasmáticas, las imágenes de microscopía muestran que las células $CD138^+$ halladas se localizaron en la región entre criptas y vellosidades en tejido normal, mientras que en enteropatía se encontraron principalmente en agregados en la zona pericriptica. A diferencia de lo observado para linfocitos B $CD20^+$, el marcador de membrana $CD138$ no colocalizó con MICA. El patrón de marcación hallado en

células plasmáticas fue citoplasmático y la marcación se distribuyó en forma difusa en un anillo perinuclear homogéneo (**Figura 17 v**).

El análisis cuantitativo de la expresión de MICA en células plasmáticas mostró que el 58.8%, 56.1% y el 45.6% de las células CD138⁺ expresan MICA en controles, enteropatías severas y moderadas/leves, respectivamente (**Figura 19**). Aunque no encontramos diferencias significativas entre los porcentajes de células dobles positivas halladas en cada caso, el número total de células CD138⁺ en enteropatías severas fue mayor que lo hallado en controles. Esto es consecuencia del aumento masivo en el número total de células CD138⁺ halladas en muestras con enteropatía. Es así que, en el caso de las enteropatías severas, por ejemplo, observamos un incremento de cinco veces en el número de células CD138⁺ con respecto a individuos control. Esta descripción coincide con el patrón histológico característico en EC activa.

Como hemos visto, el infiltrado celular en la enteropatía se compone mayoritariamente de células plasmáticas y en menor medida de linfocitos T. Sin embargo, aunque en mucho menor número, desde el punto de vista funcional son muy relevantes las poblaciones de células dendríticas y macrófagos. Con este fin, hemos empleado los marcadores CD68, HAM56, CD1a y CD11c, los cuales permiten evaluar diferentes subpoblaciones de macrófagos y células dendríticas intestinales. El análisis por microscopía confocal y de fluorescencia mostró un muy bajo número de células positivas. En ensayos de colocalización con MICA observamos macrófagos HAM56⁺ (**Figura 17, vi**) o CD68⁺ (**no mostrado**) que expresan MICA en muestras con enteropatía severa. El pequeño número de células HAM56⁺ por unidad de muscularis mucosae (m.m.) encontradas, no permite realizar un análisis estadístico. Aunque no encontramos expresión de MICA en células CD11c⁺ (**Figura 17, vii**) o CD1a⁺ (**no mostrado**) no podemos descartarla debido al bajo número de células observado.

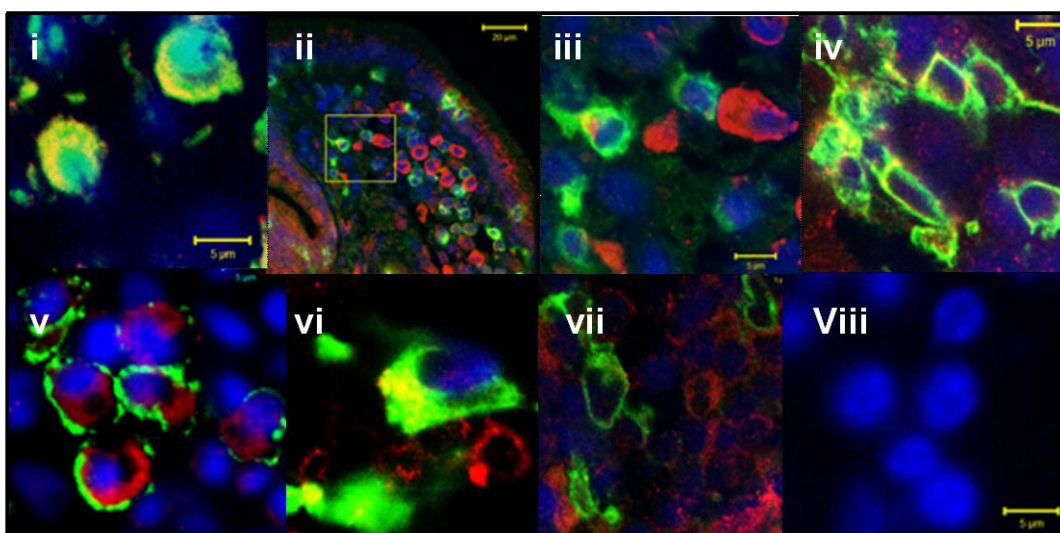


Figura 17. Caracterización de las células de lámina propia que expresan MICA. Análisis por microscopía confocal de fluorescencia en secciones de biopsias duodenales fijadas con paraformaldehído e incluidas en parafina. Se estudiaron tejidos con enteropatía severa (i, vi, v, vi, vii, viii), y leve (ii, iii). Se emplearon anticuerpos conjugados en color verde según i. células CD3⁺. ii. Células CD7⁺. iii. Magnificación de ii. iv. Células CD20⁺. v. células CD138⁺. vi. Células HAM-56⁺. vii. Células CD11c⁺. viii. Anticuerpo control de isotipo. En todas las secciones se incluyó MICA (rojo), núcleos (azul). (Magnificación 100x).

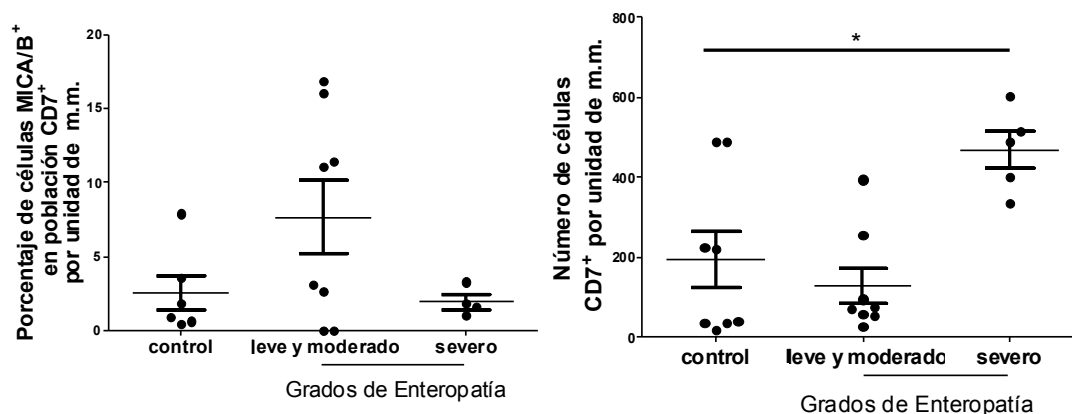


Figura 18. Análisis cuantitativo de la expresión de MICA en células CD7⁺. El recuento se realizó en unidades de muscularis mucosae (m.m.) de secciones de biopsias duodenales marcadas con MICA y CD7 en muestras de 6 controles no celíacos, 8 enteropatías leves y moderadas y 4 enteropatías severas. Se grafica el porcentaje de células MICA⁺ en la población CD7⁺ (panel izquierdo) y número total de células CD7⁺ por unidad de m.m. en cada uno de los grupos analizados (panel derecho). Test de Kruskal Wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns. *p≤0.05.

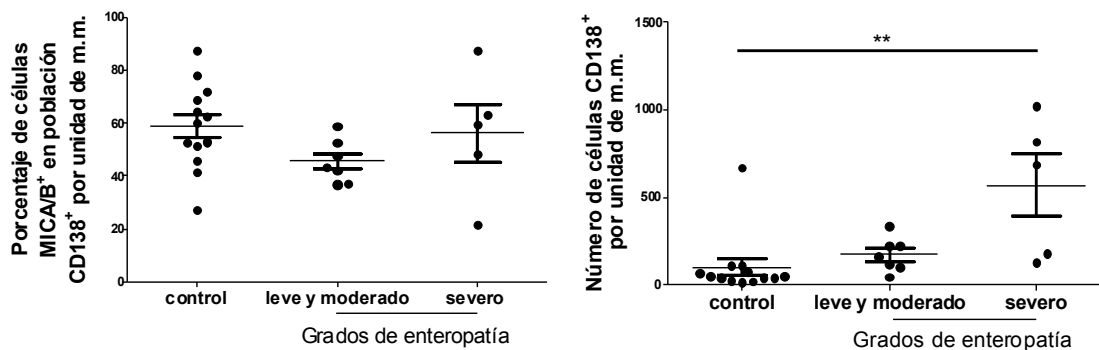


Figura 19. Análisis cuantitativo de la expresión de MICA en células plasmáticas. El recuento se realizó en unidades de muscularis mucosae (m.m.) de secciones de biopsias duodenales marcadas con MICA y CD138 en muestras de 13 controles no celíacos, 7 enteropatías leves y moderadas y 5 enteropatías severas. Se grafica el porcentaje de células MICA⁺ en la población CD138⁺ (panel izquierdo) y número total de células CD138⁺ por unidad de m.m. en cada uno de los grupos analizados (panel derecho). Test de Kruskal wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns, **p≤0.01.

Discusión

MICA es una molécula asociada a estrés celular. Su expresión fue descrita originalmente en varios tejidos, en particular en intestino (Groh, *et al.*, 1996). Las primeras observaciones indicaron que se producía en el epitelio intestinal pero su expresión no se caracterizó en detalle. Como hemos mencionado, IFN γ es la citoquina más abundante en mucosa con EC activa y domina el proceso patogénico; sin embargo, a diferencia de las moléculas de HLA clásicas, MICA no es inducible por IFN γ . Aunque no hay estudios sobre la regulación de la expresión de MICA en intestino delgado, Hue *et al.* (2004), mostraron que la incubación de biopsias duodenales de pacientes celíacos en tratamiento con dieta libre de gluten con el péptido de gliadinas p31-43, inducía aumento en la expresión de MICA en el epitelio, siendo este fenómeno dependiente de IL-15. Esta fue la primera demostración funcional de la inducción de MICA en intestino por un péptido de gliadinas relevante en la EC. El p31-43 también induce la producción de IL-15 y la apoptosis de enterocitos en biopsias de pacientes celíacos en tratamiento (Maiuri *et al.*, 2003). A su vez, la producción de IL-15 potencia la actividad citotóxica de linfocitos intraepiteliales (Meresse *et al.*, 2004; Hue *et al.*, 2004; Meresse *et al.*, 2006; Di Sabatino *et al.*, 2006; Ebert *et al.*, 2005). El conjunto de estos resultados condujo a la hipótesis de que la inducción de MICA en la superficie de los enterocitos los marca para la apoptosis inducida vía el reconocimiento por el receptor de activación NKG2D presente en linfocitos intraepiteliales. Este mecanismo sería parte de los eventos tempranos desencadenados en la patogenia de EC.

Sin embargo, si bien se observó incremento en MICA, los estudios que se realizaron por inmunohistoquímica no permitieron caracterizar en detalle la localización celular de MICA. Los cambios de expresión durante la enteropatía así como una completa descripción de la localización de MICA son elementos indispensables para establecer el rol de MICA en la patogenia.

Nuestro objetivo inicial fue estudiar si existían cambios en la expresión de MICA en tejidos con distinto grado de lesión histológica. Estudiamos por inmunohistoquímica un elevado número de muestras representativas de tejidos con histología normal así como con distintos grados de enteropatía. Nos interesó estudiar muestras de tejido duodenal de población pediátrica de corta edad con el fin de reducir los efectos generados en el tejido en un proceso crónico de muy larga evolución.

El análisis por inmunohistoquímica mostró que la expresión de MICA fue claramente mayor en duodeno de pacientes celíacos al diagnóstico que en controles (**Figuras 4 y 5**). Mediante un score arbitrario de intensidad de marca pudimos observar que, en forma significativa, las muestras con enteropatía severa y moderada mostraron mayor score de intensidad de expresión de MICA. Los scores más elevados se observaron en muestras con atrofia total. La expresión de MICA a lo largo del epitelio duodenal resultó variable, encontrando en la punta de la vellosidad a las células que lo expresan más intensamente. Así como había sido observado anteriormente, otras células, diferentes a los enterocitos, también expresan MICA (Hue *et al.*, 2004; Eagle *et al.*, 2009; Allegretti *et al.*, 2005; Allegretti *et al.*, 2006). Observamos que gran parte del infiltrado linfocitario, característico de la enteropatía en EC activa, aparece con marca positiva.

Dado que encontramos que la expresión a nivel de proteína cambia de acuerdo a la lesión histológica, decidimos estudiar la expresión de MICA a nivel de RNAm. Por RT-PCR se evaluó el nivel de MICA en RNA total obtenido de muestras de biopsia duodenales de controles no celíacos y pacientes celíacos al diagnóstico (**Figura 7**). Aunque se observó una tendencia a mayores niveles de

RNA_m de MICA en pacientes celíacos, las diferencias no fueron significativas. Resultados similares fueron descritos por Martin-Pagola y colaboradores (Martin-Pagola *et al.*, 2003), quienes posteriormente mostraron que la expresión a nivel de RNA_m se induce cuando piezas de biopsia duodenal de pacientes celíacos en tratamiento son incubadas con péptidos de gliadinas (Martin-Pagola *et al.*, 2004). Esto demuestra que los péptidos de gliadinas pueden inducir *in vitro* la expresión de MICA como un fenómeno de respuesta temprana. Sin embargo, existiría un diferente nivel de regulación en la inducción y vida media del RNA_m y de la proteína, en especial cuando se considera esta lesión crónica de muy larga evolución.

El análisis de expresión por inmunohistoquímica en intestino de pacientes celíacos en dieta reveló que los niveles de MICA disminuyen cuando se comparan con tejido de los mismos pacientes obtenidos al momento del diagnóstico (**Figura 8**). Resultados similares fueron descritos por Hue (Hue *et al.*, 2004). Es claro entonces, que *in vivo* la presencia de gluten en la dieta es el inductor de MICA en intestino proximal. A su vez, estudiando el patrón de expresión por microscopía confocal de fluorescencia observamos por primera vez que la distribución de la marca permanece igual a lo que se observa en la enteropatía activa y no retorna al patrón observado en tejido normal (**Figura 9**). Esto sugiere que si bien los mecanismos que inducen la expresión de MICA no están activos en pacientes celíacos en tratamiento, con la histología intestinal normalizada, algunos de los procesos patogénicos no son revertidos completamente o existiría un bajo grado de estimulación por ingesta inadvertida de gluten. En cualquier caso, estas observaciones indicarían que el cambio en el patrón de expresión de MICA es un indicador más sensible que los cambios histológicos de un proceso inflamatorio que permanece activado.

Nuestro estudio permitió observar que la intensidad de expresión de MICA correlaciona con la lesión histológica, sugiriendo que existen mecanismos que regulan la expresión y que son inducidos por el gluten ingerido. El análisis de expresión mediante inmunohistoquímica, mostró una distribución más extendida de MICA. Células presentes en el epitelio, diferentes a los enterocitos, y en *lamina propria* aparecen marcadas. En este sentido, se ha descrito la expresión de MICA en diversos tipos celulares como fibroblastos (Zwirner *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2006), células endoteliales (Zwirner *et al.*, 1998), células dendríticas (Jinushi *et al.*, 2003), células T (Molinero *et al.*, 2002), células plasmáticas (Carbone *et al.*, 2005), así como en células tumorales e infectadas (Groh *et al.*, 1999; Groh *et al.*, 2001).

La inmunohistoquímica no permite una detallada caracterización de los diversos tipos celulares que expresan MICA y sus patrones de marca. Por lo tanto, con el objetivo de analizar la localización de MICA a nivel celular se empleó microscopía confocal de fluorescencia.

El estudio de secciones de biopsias duodenales de controles no celíacos así como de pacientes celíacos con diferentes grados de enteropatía mostró claramente que MICA se encuentra en el compartimiento intracelular (**Figuras 9, 10 y 11**). A diferencia, Suemizu (Suemizu *et al.*, 2002), utilizando microscopía de fluorescencia, asoció la expresión de MICA a la membrana basolateral de enterocitos. Los resultados de Hue (Hue *et al.*, 2004), empleando inmunohistoquímica y citometría de flujo, indicaron que MICA se localiza en el compartimiento intracelular de los enterocitos en intestino normal mientras que en EC activa se ubica en la superficie celular.

El análisis del patrón de marca observado en enterocitos de controles no celíacos es difuso mientras que en EC activa su expresión se presenta como agregados peri y/o supranucleares en

dirección al polo apical. Los agregados mencionados sugieren tal vez asociación con el sistema de membranas de la célula (localización vacuolar o endosómica), y no descartarían una asociación con retículo endoplásmico o aparato de Golgi. En este sentido se ha observado colocalización de MICA con proteínas de retículo endoplásmico tanto *in vitro* como *in vivo* trabajando con melanomas humanos (Fuentes *et al.*, 2008).

Aunque claramente la expresión de MICA observada por microscopía confocal en nuestro estudio es intracelular, la metodología empleada no descarta que exista expresión en membrana. Es así, que mediante citometría de flujo se observó que MICA se encuentra en superficie (**Figura 12**), aunque el número de casos fue muy reducido, no se observaron los cambios de expresión mencionados por Hue (Hue *et al.*, 2004) al comparar células aisladas de tejido normal y con enteropatía.

De esta manera, observamos que en los enterocitos, MICA se encuentra en el compartimento intracelular. En enteropatía, MICA forma agregados supranucleares en dirección apical. En menor medida, MICA se encuentra en la membrana celular donde podría interactuar con el receptor NKG2D. Mediante el análisis de células NK y MICA no encontramos ningún evento de interacción entre NK y enterocitos, aunque este puede ser un evento poco frecuente de visualizar. El análisis del compartimento intraepitelial reveló la existencia de linfocitos que expresan MICA tanto en controles como en celíacos. El compartimento intraepitelial abarca diferentes tipos de linfocitos, que en su mayoría expresan el marcador CD7, un antígeno temprano y persistente a lo largo de la ontogenia T, que se utiliza como marcador de linaje de linfocitos T (Sutherland *et al.*, 1984; Haynes *et al.*, 1989; Hao *et al.*, 2008).

La mayoría de los linfocitos intraepiteliales MICA⁺ fueron células CD7⁺. En éste tipo celular, MICA se encontró asociado al espacio intracelular, distribuido en grandes agregados polarizados hacia un extremo de la célula. El mayor porcentaje de linfocitos intraepiteliales MICA⁺CD7⁺ lo encontramos en enteropatías leves y moderadas. Mientras que los menores porcentajes se observaron en enteropatías severas, sugiriendo que diversos mecanismos estarían activos en la lesión crónica y podrían inhibir la expresión de MICA en este tipo celular o que las células MICA⁺ son eliminadas. En este sentido, se ha descrito la expresión de MICA en linfocitos T asociada a la actividad de NFκβ (Molinero *et al.*, 2004), factor de transcripción involucrado en procesos de activación celular (Molinero *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 1999; Ballard, 2001). Dichos linfocitos serían capaces de interactuar con células NK en las áreas T de órganos linfoides secundarios (Ferralazzo *et al.*, 2004; Fehniger *et al.*, 2003) como parte de mecanismos efectores de la respuesta inmune, y podrían sufrir citotoxicidad. De igual manera, podríamos considerar que la expresión de MICA en linfocitos intraepiteliales de duodeno celíaco podría formar parte de mecanismos tendientes a contribuir al silenciamiento de una respuesta inmune exacerbada en forma crónica.

En *lamina propria*, se encontraron diferentes poblaciones de células MICA⁺. Los linfocitos T y B constituyen la mayoría de las células MICA⁺ halladas. El uso de los marcadores CD3 y particularmente CD7, debido a la claridad de las imágenes obtenidas, caracterizaron la expresión de MICA en linfocitos T tanto en duodeno normal como en enteropatía (**Figuras 16 y 17**).

Encontramos que los linfocitos B y células plasmáticas, caracterizados por la expresión de CD20 y CD138, respectivamente, expresan MICA tanto en tejido con histología normal como en EC activa. Las células CD20⁺ fueron las únicas que mostraron colocalización de MICA y CD20 en

membrana plasmática (**Figura 17iv**). La mitad de las células plasmáticas fueron MICA⁺, y mostraron un anillo externo de CD138 y una marcación de MICA homogénea en todo el citoplasma. Evidenciando un cambio en el patrón de expresión de MICA asociado a la maduración y activación del linfocito B. Sabemos que el linfocito B en su transición a célula plasmática secretora de inmunoglobulinas induce la expresión de ciertas proteínas asociadas a respuestas de estrés celular, fundamentalmente estrés de retículo endoplásmico. Esta respuesta fisiológica de estrés es necesaria para tolerar la producción constitutiva de altas cantidades de proteínas a nivel del retículo (Gass *et al.*, 2002; Shaffer *et al.*, 2004). En este sentido la expresión de MICA podría acompañar dichos cambios asociados a respuestas de estrés en el linaje B.

En *lamina propria* se encuentran además células presentadoras de antígeno, tanto macrófagos como células dendríticas que pueden estudiarse por la expresión de CD68, CD11c, CD163 y CD103 (Raki *et al.*, 2006; Beitnes *et al.*, 2011). Estas poblaciones si bien minoritarias, resultan ser funcionalmente muy relevantes. En este estudio, mostramos que algunos macrófagos (HAM-56⁺) expresan MICA (**Figura 17 vi, vii**), pero no hallamos células dendríticas MICA⁺. Sin embargo, dado que el número de células dendríticas es bajo, se requiere un estudio más extenso para llegar a una conclusión sobre la expresión de MICA en estas células.

En la *lámina propia* entonces encontramos tanto células de estirpe T como B con expresión de MICA. Además observamos que dicha expresión cambia con el tipo de célula y su estadio de maduración, con esto se infiere que la expresión de MICA, como ligando asociado a mecanismos de estrés celular, podría ser parte de mecanismos de autolimitación de las respuestas exacerbadas relativas al proceso patológico y así, en un enfoque más amplio, formar parte de los procesos homeostáticos tendientes al control de poblaciones.

Conclusiones

El estudio por inmunohistoquímica asociado a microscopía de fluorescencia con análisis confocal reveló la existencia de diferentes tipos celulares en mucosa duodenal humana capaces de expresar MICA/B; cada uno exhibiendo un patrón característico de expresión. Dichos patrones irían desde una distribución citoplasmática difusa en plasmocitos, pasando por la expresión en membrana externa observada en linfocitos B, hasta un moteado citoplasmático grueso asociado a enterocitos y linfocitos T. Si bien era ya conocida para la población de enterocitos, esta expresión no estaba descrita en enfermos celíacos como fundamentalmente citoplasmática, sino de membrana basolateral. Por otra parte la expresión en células de los compartimentos intraepitelial y lámina propia era desconocida o solo sugerida para algún tipo celular, con escasos o nulos registros a cerca de proporciones de células MICA/B⁺ en cada caso. En el compartimento intraepitelial la mayoría de las células MICA/B positivas fueron células CD7⁺; mientras que en el caso de la lámina propia las poblaciones MICA/B⁺ más relevantes fueron linfocitos T CD3⁺ y CD7⁺ y linfocitos B / células plasmáticas CD138⁺.

Esta caracterización amplia de la expresión de MICA/B en mucosa intestinal que demuestra que este ligando de NKG2D está expresado en células T (LIEs y de *lamina propria*) y células plasmáticas (de *lamina propria*), constituye la primera evidencia de expresión *in vivo* de MICA/B en células T, anteriormente se demostró expresión en modelos *in vitro* de células T activadas (Molinero *et al.*, 2002; Molinero *et al.*, 2003; Molinero *et al.*, 2006).

Si bien se observa una muy baja expresión de MICA/B en intestino control, en enfermedad activa ésta aumenta, observándose correlación entre el score de marcación y el grado de afectación de la mucosa. De hecho los cortes estudiados con grandes infiltrados leucocitarios resultaron poseer altos niveles de células MICA/B⁺. Corroboramos que la dieta libre de gluten permite que la expresión de MICA/B retorne a valores control, aunque observamos que no se logra retomar el patrón de expresión hallado para enterocitos de muestras control, sino que se observa una expresión citoplasmática peri o supranuclear en gránulos mucho más pequeños que los vistos en el caso de mucosas con lesión activa. También en el caso de enterocitos de muestras con enteropatía vimos una tendencia a mayores niveles de expresión de MICA/B en las puntas de vellosidad.

Con todo esto creemos que la expresión de MICA/B, ya descrita como parte de un proceso puntual que involucra la muerte de enterocitos en duodeno asociada a patología celíaca; formaría parte de un proceso más global con afectación de más de un tipo celular. Estos hallazgos hablarían de un rol más general para la expresión de MICA/B asociada a la inmunobiología de la mucosa intestinal humana.

Al ser MICA/B una familia de proteínas asociadas a la respuesta de estrés celular, para poder entender algo más a cerca de su expresión en tejido ligada o no a patología, deberíamos estudiarla en el contexto de dicha respuesta de estrés y ver si es posible modularla utilizando diferentes modelos de estrés conocidos. Sería también útil analizar si la expresión observada *in situ* se asocia realmente a estructuras de estrés celular en mucosa celíaca en enfermedad activa.

Materiales y Métodos.

Biopsias duodenales.

Como parte del protocolo diagnóstico de EC, y bajo consentimiento informado de familiares responsables de los pacientes, se tomaron muestras de biopsia duodenal de pacientes menores de 5 años que presentaban signos y síntomas gastrointestinales que configuran la sospecha clínica de EC. Las muestras fueron obtenidas de pacientes atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital de Niños de La Plata.

Los pacientes fueron clasificados en 5 grupos en función a la histología que presentaron las muestras de duodeno. 49 pacientes correspondieron al grupo de “enteropatías severas”, que presentaron atrofia vellositaria, hiperplasia de criptas, infiltrado celular característico y prueba de anticuerpos antiendomiso positiva. 29 pacientes formaron el grupo de “enteropatías moderadas”, con una relación (altura de vellosidad/profundidad de las criptas) variable entre 1 y 2; 24 pacientes constituyeron el grupo de “enteropatías leves”, con una relación (altura de vellosidad/profundidad de las criptas) variable entre 2 y 2,5. Ambos grupos de pacientes, con lesión histológica moderada y leve, presentaron pruebas serológicas y sintomatología compatibles con EC. Cuatro pacientes formaron el grupo de “pacientes en dieta libre de gluten”, casos que fueron diagnosticados y luego siguieron una dieta libre de gluten por al menos dos años, tiempo al que se tomó la muestra de biopsia duodenal. Esta muestra presentó histología normal, coincidente con la total recuperación clínica del estado inicial del paciente. El grupo “control” incluyó a 44 pacientes con prueba de anticuerpos antiendomiso negativa y biopsias duodenales con histología conservada.

Para el análisis por citometría de flujo de células epiteliales duodenales utilizamos muestras de biopsias de adultos obtenidas del Servicio de Gastroenterología del Hospital San Martín de La Plata. En este caso las muestras control fueron tomadas de pacientes que presentaron dispepsia, con prueba de anticuerpos antiendomiso negativa e histología duodenal conservada. Los enfermos celíacos correspondieron al grupo de “enteropatía severa” con prueba de anticuerpos antiendomiso positiva y alteración histológica compatible con Enfermedad Celíaca.

El presente estudio se realizó bajo consentimiento informado de todos los pacientes, obtenido de sus responsables legales, o de ellos mismos en el caso de los adultos; y con la aprobación de los Comités Científico y de Bioética del Instituto de Investigaciones Pediátricas de La Plata, IDIP, Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata; y del Hospital San Martín de La Plata.

Procesamiento y Conservación de las muestras de biopsia duodenal.

Durante la endoscopia gastrointestinal alta, se tomaron tres muestras de biopsia de duodeno distal. Las piezas se fijaron en medio de Bowin para el análisis histológico. En gran parte de los estudios se utilizaron cortes de piezas de banco del Servicio de Patología del Hospital de Niños de La Plata. En situaciones experimentales específicas se tomaron piezas de biopsias adicionales que fueron fijadas con paraformaldehído o en OCT para los estudios de inmunohistoquímica o fluorescencia. En otros casos, las muestras fueron colectadas en RNAlater (Ambion) para aislamiento de RNA total y medida por PCR cuantitativa.

En los estudios de citometría de flujo, las piezas de biopsias fueron transportadas en frío en medio HBSS suplementado con Gentamicina 0,5g/l (Laboratorios Bagó).

Clasificación Histológica

Los estudios morfológicos se realizaron en microscopio de campo claro a partir de 8 secciones de biopsia duodenal bien orientadas. Las secciones se colorearon con Hematoxilina-Eosina (H&E); las muestras mal orientadas no se consideraron, en esos casos, los pacientes no fueron incluidos en el estudio. La clasificación histológica se realizó siguiendo los criterios de diagnóstico ya establecidos en el Servicio de Patología del Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata. Dichos criterios se basan en la determinación de la relación altura de vellosidad/profundidad de cripta en al menos 5 pares vellosidad-cripta correctamente orientados y se expresan como la mediana de las medidas \pm el desvío estándar.

Extracción de RNA preparación de cDNA y procedimiento de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

El RNA se extrajo de las muestras de biopsia endoscópica utilizando Trizol® (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El RNA total se cuantificó a 260 nm, y se determinó la relación 260/280 nm para calcular la pureza de las muestras y evitar la probable contaminación con proteínas. Se realizó además electroforesis en gel de Agarosa para corroborar la alta calidad del RNA. 1 μ g de RNA se mezcló con 200ng de random primers (Molecular Probes Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 μ l de 10mM deoxy-(d)NTP mix, y agua; se incubó la mezcla a 65°C por 5 min, se enfrió en hielo y se centrifugó brevemente. Dicha mezcla se combinó con 5x first-strand buffer, DTT, RNase inhibitor, y M-MLV-RT (Molecular Probes Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), se incubó a 37°C por 50 min y a 70°C por 15 min. La reacción se realizó en un equipo Eppendorf MasterCycler Gradient. El cDNA resultante se utilizó en experimentos de qPCR junto con SYBR Green Supermix (BioRad), de acuerdo a las especificaciones del fabricante; con los siguientes primers:

MICA forward (5'-GGATGACCCTGGCTCATATCA-3') (Eagle *et al.*, 2009)

MICA reverse (5'-AGATTAGGGTCTGTGAGATCCATG-3')

β -actina forward (5'-ATGGGTCAGAAGGATTCCTATGTG-3') (Bongers *et al.*, 2003)

β -actina reverse (5'-CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGTC-3').

Para la detección a tiempo real se utilizó el equipo IQ5 Optical Lid BioRad MyIQ Cycler Real Time PCR detection system. Se determinó expresión relativa y se expresó como unidades arbitrarias.

Anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal denominado -D7" se utilizó para estudiar la expresión de MICA/B. Este anticuerpo fue producido por el grupo de trabajo del Dr. Norberto Zwirner, el cual lo proveyó para este proyecto. La producción del anti-MICA/B mAb, D7, fue descrita previamente (Molinero *et al.*, 2004). Si bien este anticuerpo reconoce MICA y parcialmente la molécula MICB, por simplicidad, en este trabajo se referirá el reconocimiento de la molécula MICA. Como anticuerpo control isotipo se utilizó un anticuerpo monoclonal IgG2b de ratón comercial (BPC4, Ancell).

Los anticuerpos específicos contra CD138 (M15, syndecan1), CD68 (P6-M1), HAM 56 (MO632), CD3 (M7254 y Polyclonal Rabbit Anti-Human, (A0452)) y CD20 (L26) fueron de DAKO; el anti-CD7 (CD7.272) (Novocastra); el anti-CD57 (NK1)(Biogenex); el anti-CD1a (MOB363)(Diagnostic Biosystems); el anti-CD11c (EP1347Y)(Abcam); el anti-CD3-PECy5 (UCHT1) (BD Biosciences); la estreptavidina anti-IgG de cabra, marcada con Cy3 (705) (Jackson ImmunoResearch); la IgG-FITC de

cabra anti-IgG de ratón (sc-2010)(Santa Cruz Biotechnology). La IgG-FITC anti-IgG de conejo (RG-96) (Sigma); la IgG de cabra anti IgG de conejo marcada con Alexa 488 (A11008) (Invitrogen).

Marcación Inmunohistoquímica.

Secciones de 5µm de espesor obtenidas de material duodenal fijado en medio de Bowin e incluidas en parafina fueron rehidratadas, bloqueadas con suero normal de caballo al 5%, y marcadas con 15 µg/ml del anticuerpo D7 o su control de isotipo. Los anticuerpos unidos al tejido fueron detectados con el kit Vector Vectastain ABC seguido del kit de sustrato Peroxidasa (DAB, Vector Vectastain) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Las muestras se contracoloraron con Hematoxilina, se deshidrataron a través de un tren de alcoholes y se montaron. Un score arbitrario de intensidades de marca fue utilizado para comparar resultados. Dicho score fue definido en números de uno a cuatro, de acuerdo a la intensidad de la marcación con inmunoperoxidasa; el control de isotipo fue definido como score=0 (cero). Las muestras se analizaron en un microscopio Nikon Eclipse E400. Tres slides bien orientados por paciente se utilizaron en la marcación. En todos los análisis cuantitativos realizados sobre secciones de tejido, las muestras fueron divididas en unidades de *muscularis mucosae* (m.m.). Una unidad de m.m. representa un área de 6 criptas. De dos a cuatro unidades de *muscularis mucosae* se analizaron por muestra. El análisis se desarrolló a ciegas por dos investigadores. El estudio completo se realizó por duplicado.

Microscopía confocal.

Las muestras de biopsia intestinal se congelaron en matrices de OCT sobre hielo seco y se mantuvieron a temperaturas de -70°C hasta su uso. Secciones de tejido de 6µm fueron fijadas en acetona y marcadas con los diferentes anticuerpos utilizados.

Para obtener una mejor preservación de la morfología del tejido y siguiendo la rutina de diagnóstico de EC, las muestras de biopsia intestinal también se fijaron en medio de Bowin y luego fueron incluidas en parafina. Secciones de biopsias incluidas en parafina se rehidrataron y recuperaron con solución de recuperación de tejido "Target Retrieval Solution" (Dako). Todos los slides con los distintos tratamientos del tejido utilizados fueron, una vez rehidratados, bloqueados con suero normal inactivado de caballo o cabra al 5% e incubados secuencialmente con anticuerpos monoclonales específicos de linaje seguidos de IgG de cabra anti-ratón o anti-conejo marcadas con FITC. El tejido fue bloqueado con 5% de suero normal de ratón inactivado y luego fue incubado con 150 µg/ml del anticuerpo monoclonal D7 biotinilado seguido de estreptavidina marcada con Cy3. Para la coloración de los núcleos se utilizaron los colorantes de ácidos nucleicos DAPI y SYTO® 13 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (S-7575), ambos de Molecular Probes®, Invitrogen. Se utilizaron controles de isotipo en todas las marcaciones. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio PASCAL-LSM Confocal Laser Scanning (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). El procesamiento de las imágenes se realizó con el software LSM 5 v 3.2. Los estudios de microscopía de fluorescencia se realizaron utilizando además un microscopio de fluorescencia Olympus BX60.

Aislamiento de células epiteliales y citometría de flujo.

El aislamiento de células epiteliales se realizó según protocolos convencionales (Bracken *et al.*, 2008) a partir de cuatro piezas de biopsias duodenales de cada paciente. Estas se lavaron en medio de cultivo RPMI conteniendo 10% de suero fetal y fueron procesadas inmediatamente. Las

biopsias se agitaron en medio libre de calcio y magnesio HBSS (Gibco) conteniendo 1 mM EDTA (Sigma, USA) y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Luego fueron agitadas vigorosamente a mano diez veces con el fin de desprender mejor las células del tejido y lograr una suspensión turbia. Las muestras se filtraron a través de una malla de 80- μ m (BD Biosciences, San José, CA, USA) y la suspensión se recuperó en tubos Falcon de 50ml que fueron centrifugados a 400 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 5 ml de FACS buffer, se centrifugó y fue resuspendido en 1 ml de FACS buffer. El recuento celular se realizó en cámara de Newbawer.

Para el análisis por citometría de flujo de las células aisladas de biopsias intestinales, 0.5×10^6 células/tubo se incubaron con suero humano inactivado para bloquear receptores Fc. Se realizaron marcaciones de superficie e intracitoplasmáticas permeabilizando a las células utilizando el kit comercial Fixation & Permeabilization Kit (eBioscience) según las especificaciones del fabricante. Las células fueron incubadas con anti-CD3-PECy5 y/o anti-MICA D7 seguido de IgG-FITC anti-ratón; se utilizaron anticuerpos control de isotipo en todos los casos analizados. El análisis de las poblaciones se realizó en un equipo BD FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences), utilizando softwares CELLQuest™ (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Análisis estadístico

Para los gráficos y el análisis estadístico de los datos utilizamos el software GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA). En el análisis de los datos utilizamos el test de análisis no paramétrico de Kruskal Wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns o el U test no paramétrico de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Capítulo 2. Regulación de la Expresión de MICA.

Parte de los resultados del presente capítulo forman parte del artículo

“Broad MICA/B expression in the small bowel mucosa: a link between cellular stress and celiac disease”.

Yessica Allegretti, Constanza Bondar, Luciana Guzman, Eduardo Cueto Rua, Nestor Chopita, Mercedes Fuertes, Norberto W. Zwirner and Fernando G. Chirido. PLOS ONE. Sept.13, 2013. doi:10.1371/journal.pone0073658.

Introducción.

Es habitual que a lo largo de su vida, las células se vean expuestas a diversas situaciones de estrés, dentro de las que se pueden mencionar hipoxia, radiaciones ambientales, estrés térmico, privación de nutrientes, exposición a toxinas, radicales libres o compuestos derivados de microorganismos patógenos. Es sabido que estas condiciones podrían causar tanto un daño irreparable como la muerte celular. Por consiguiente, para contrarrestar estos procesos, las células han desarrollado estrategias complejas con el fin de afrontar estas situaciones de estrés.

Como describimos en el capítulo anterior, las moléculas de MICA tienen funciones asociadas a las respuestas en condiciones de alarma celular. Ya hemos mencionado que el promotor de MICA contiene elementos de respuesta al estrés, primeramente caracterizado como estrés térmico (del inglés *heat shock response elements*). Estudios hechos en linfocitos T activados y células HeLa han probado que en el intrón 1 del gen de MICA existe una región de unión a NF- κ B, siendo este uno de los reguladores críticos en la expresión de MICA (Molinero *et al.*, 2004). Bajo condiciones de estrés celular tales como, estrés térmico, oxidativo, infecciones virales y transformación tumoral, se observa un elevado nivel de expresión de MICA (Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1998; Venkataraman *et al.*, 2007; Gasser *et al.*, 2005; Groh *et al.*, 2001).

En este sentido, nuestra hipótesis fue que en EC, los mecanismos puestos en juego desde el inicio de la patología y aún en la lesión crónica, podrían desencadenar un proceso de estrés en la mucosa intestinal que lleve a la expresión de MICA en determinados tipos celulares, tales como linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y enterocitos. Dicha expresión en diversas células de mucosa duodenal, según hemos descrito en el capítulo 1, podría estar relacionada a una situación de estrés en el tejido con diferentes manifestaciones en lo que respecta a la expresión de MICA en función del tipo de célula afectada.

Para estudiar entonces la expresión de estas proteínas en mucosa intestinal celíaca decidimos evaluar la respuesta al estrés que se desarrolla en distintos modelos.

La respuesta de estrés involucra la producción de varias familias de proteínas y la activación de diversas vías de señalización celular que llevan a contener y/o revertir los procesos deletéreos en la célula. Es sabido que la agregación de proteínas celulares se facilita por cambios en el plegamiento como consecuencia de la exposición a agentes que causan estrés celular, como por ejemplo agentes oxidantes o calor (Wetzel, R. 1994; Fink, A.L. 1998). Para entender cómo reacciona una célula al estar sometida a una condición particular de estrés debemos recordar ciertos aspectos que hacen a su biología y al funcionamiento de determinadas organelas fundamentales en dicha respuesta.

El retículo endoplásmico (RE) es, tal vez, uno de los sitios más estudiados en lo que respecta a la respuesta de estrés. De hecho, sabemos que es el responsable de generar la respuesta a proteínas mal plegadas, UPR (del inglés, *unfolded protein response*), cuyos mecanismos han sido conservados evolutivamente y son compartidos tanto por mamíferos como por levaduras y algunos parásitos. Dicha respuesta se activa al reconocer una acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico (Hetz, 2012); y tiene los siguientes objetivos fundamentales: restaurar el normal funcionamiento de la célula mediante la interrupción de la traducción de proteínas, activar la degradación de las proteínas mal plegadas por los proteasomas y activar las vías de señalización que llevan a la producción de proteínas particulares, chaperonas, involucradas en procesos de plegamiento proteico. Si estos objetivos no se desarrollan en un cierto

período de tiempo, o el problema persiste por largo tiempo, la respuesta a proteínas mal plegadas induce mecanismos de muerte celular. La respuesta a proteínas mal plegadas es también esencial en el desarrollo y supervivencia de células con función de secreción de proteínas como, por ejemplo, las células plasmáticas (Todd *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014).

La respuesta celular de estrés origina entonces, un silenciamiento transcripcional y traduccional general mediante distintas vías celulares que, entre otros efectos, permite la formación de gránulos de estrés. Estas estructuras son focos de silenciamiento de RNA mensajero en citoplasma que se forman de manera transitoria durante la respuesta de estrés. Dichos gránulos albergan complejos de iniciación de la traducción abortivos y están en equilibrio dinámico con polisomas en traducción. Entre las proteínas que contienen encontramos a TIA-1, (del inglés *T-cell intracellular antigen 1*"), proteína que se encuentra en núcleo bajo condiciones fisiológicas, mientras que cuando la célula se somete a condiciones de estrés celular trasloca al citoplasma y se asocia a gránulos de estrés (Buchan and Parker, 2009). Consecuentemente, los gránulos de estrés pueden ser identificados como gránulos citoplasmáticos TIA-1⁺ (Gilks N. *et al.*, 2004). A diferencia de los gránulos de estrés, otros gránulos ricos en RNA conocidos como cuerpos de procesamiento, o PB (del inglés *"processing bodies"*), se expresan en las células constitutivamente y además, son rápidamente inducidos en situación de estrés celular. Los cuerpos de procesamiento y los gránulos de estrés, con diferentes composiciones, pueden coexistir en una misma célula (Loschi *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2010).

Actividad de chaperonas, rutas de degradación de proteínas mal plegadas, agregados proteicos, cuerpos de inclusión y agrosomas.

Existen estudios que afirman que alrededor del 30% de las proteínas que se sintetizan en la célula son productos ribosomales defectuosos que pasan a ser degradados en proteasomas poco tiempo después de ser sintetizados (Schubert *et al.*, 2000). Aún si esta proporción de proteínas resulta exagerada, sabemos que existe un flujo constante de proteínas mal plegadas en la célula que debe ser degradado (Hetz, 2012). Es sabido que tanto las proteínas secretorias como de membrana que no adquieren un plegamiento adecuado, generalmente pasan del retículo al citosol y sufren degradación en proteasomas (Kopito, R.R. 1997).

Sin embargo, debemos tener en cuenta que para tener acceso a los sitios activos de degradación de proteasomas, el sustrato debe traslocarse a través de poros pequeños que resultan muy estrechos para el pasaje de dominios plegados (Voges *et al.*, 1999); con lo cual la falta de plegamiento es un requisito necesario para alcanzar la degradación (Johnston *et al.*, 1995; Thrower *et al.*, 2000).

Para afrontar situaciones que tienen que ver con el mantenimiento de una adecuada estructura proteica, en lo que respecta a interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro, adquisición de la estructura cuaternaria, e incluso la traslocación a través de membranas; evolutivamente surgen familias de proteínas como las proteínas de estrés térmico (HSP), cuya función es acompañar y garantizar el correcto plegamiento de las nuevas proteínas en retículo. Dichas familias son también conocidas con el nombre de chaperonas.

El trabajo de las chaperonas en retículo es aún más complejo si consideramos que se desarrolla en un medio extremadamente rico en proteínas, (la concentración de proteínas en una

célula de mamífero se estima del orden de los 180 mg/ml). En este contexto, lograr el correcto plegamiento resulta una tarea por demás difícil. Por lo tanto, analicemos ahora, ¿Qué ocurre cuando una proteína no puede plegarse correctamente y no es degradada?

En principio, se asume que la célula inicia una respuesta tendiente a replegar, dejar de producir y/o degradar la proteína existente. Sin embargo, en muchas de esas ocasiones esto no es suficiente y se producen agregados proteicos. Una vez formados estos agregados, son resistentes a proteólisis y se acumulan en cuerpos de inclusión (Speed *et al.*, 1996). En células animales, las proteínas agregadas son transportadas a cuerpos de inclusión en un transporte retrógrado dependiente de dineínas sobre microtúbulos. Este cuerpo de inclusión dependiente de microtúbulos presente en citoplasma se conoce como agresoma (Johnston *et al.*, 1998).

Los agregados proteicos pueden ser tanto estructurados (amiloides situados en el RE) como amorfos (depósitos en citosol); tienden a ser insolubles y metabólicamente estables bajo condiciones fisiológicas. Su acumulación está muy relacionada a degeneración neuronal o falla orgánica en muchas enfermedades de depósito de proteínas como en enfermedad de Alzheimer, Parkinson, enfermedades por presencia de poliglutaminas (enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, etc.), enfermedad de la vaca loca, hígado alcohólico y muchas otras patologías (**Tabla 1**). Si bien en estos desórdenes se asume muchas veces que el daño es causado por la presencia de estos agregados de proteínas mal plegadas en RE; en la actualidad hay un consenso, cada vez mayor, que considera que ciertas estructuras, como por ejemplo los amiloides, serían una respuesta protectora para la célula y las especies tóxicas podrían ser los intermediarios previos a ellos.

TABLA 1. ENFERMEDADES DE PLEGAMIENTO	
ENFERMEDAD	COMPONENTE PRINCIPAL DEL AGREGADO
ALZHEIMER	$\alpha\beta$ PEPTIDOS (PLACAS) PROTEINA TAU
ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME	PRION (ENTERA O FRAGMENTOS)
PARKINSON	α SINUCLÉINA
AMILOIDOSIS PRIMARIA SISTÉMICA	CADENAS LIVIANAS DE Igs (ENTERA O FRAGMENTOS)
AMILOIDOSIS SECUNDARIA SISTEMICA	AMILOIDE SÉRICO A (ENTERO O FRAGMENTO DE 76 RESID.)
DEMENCIA FRONTOTEMPORAL	PROTEINA TAU (WT O MUTANTE)
AMILOIDOSIS SISTÉMICA SENIL	TRANSTIRETINA ENTERA O FRAGMENTOS
POLINEUROPATIA AMILOIDE FAMILIAR I	TRANSTIRETINA (MAS DE 45 MUTANTES)
AMILOIDOSIS RELATIVA A HEMODIÁLISIS	β 2-MICROGLOBULINA
POLINEUROPATIA AMILOIDE FAMILIAR III	APOLIPOPROTEINA A I (Y FRAGMENTOS)
DIABETES TIPO II	AMILINA (FRAGMENTOS)
CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES	CALCITONINA (FRAGMENTOS)
AMILOIDOSIS DE INYECCION LOCALIZADA	INSULINA
AMILOIDOSIS RENAL HEREDITARIA	CADENA A DEL FIBRINOGENO, TRANSTIRETINA, APOLIPOPROTEINA A I, APOLIPOPROTEINA A II, LYSOZIMA, GELSOLINA, CYSTATINA C.
ATAXIA ESPINOCEREBELOSA	ATAXINAS (ENTERA O FRAGMENTOS)
ENTRE OTROS.	

El término “cuerpos de inclusión” ha sido utilizado para nombrar focos intracelulares en los que las proteínas agregadas son secuestradas. Se presentan en un bajo número, en su mayoría uno por célula. Se asume que se forman como consecuencia del auto-agregado de monómeros con estructura no nativa que forman polímeros en crecimiento (Fink A.L. 1998; Speed *et al.*, 1996). En este modelo (Kopito 2000), que plantea un único o un muy bajo número de sitios de nucleación; se propone que la adhesión de monómeros a agregados existentes está termodinámicamente favorecida debido a la gran estabilidad del agregado. El primer agregado tiende entonces a dominar la dinámica del proceso y el número de focos de agregación o cuerpos de inclusión será limitado. Este modelo trata a los cuerpos de inclusión como agregados gigantes y se adapta mejor a la agregación en distancias cortas, como por ejemplo una bacteria o una organela celular, más que a las grandes distancias que se observan en una célula de tipo neuronal.

Existe un modelo alternativo que considera que los cuerpos de inclusión serían agregados de agregados. En otras palabras, estas estructuras se formarían como consecuencia de la coalescencia de agregados individuales hacia un único o un número limitado de focos. Se ha estudiado la composición de los agregados celulares y se ha visto que, en su mayoría, contienen chaperonas moleculares, como por ejemplo: Hsp70, Hsp40, Hdj1 y Hdj2, TriC/TCP, entre otras (Hetz, 2012; Wigley *et al.*, 1999; García-Mata *et al.*, 1999). También se ha descrito la presencia en agregados de las subunidades 19S y 26S del proteasoma (Wigley *et al.*, 1999; Wójcik *et al.*, 1996; Wójcik, 1997; Fabunmi *et al.*, 2000; Antón *et al.*, 1999, Buchan and Parker, 2009). Los filamentos intermedios tipo III

como, por ejemplo, vimentina y proteína ácida glial fibrilar constituyen componentes frecuentes de agresomas (Herrmann, H. and Aebi, U. 2000).

Aunque los agresomas prominentes o los cuerpos de inclusión no sean normalmente evidentes en células no estresadas, las vías que los involucran deberían estar activas en las células y capaces de prevenir la acumulación intracelular de agregados de proteína mal plegada que ha escapado a otros procesos protectivos celulares tendientes a eliminarla. Una vez que estas rutas se saturan, el continuo afluente de agregados proteicos a un mismo sitio lo transforman en un gran depósito de desechos celulares.

Vías de señalización de estrés en retículo endoplásmico.

Al detectar entonces proteínas mal plegadas, el RE monta la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR. Estas vías comienzan en tres proteínas transmembrana (**Figura 1**): la quinasa/endonucleasa transmembrana 1 dependiente de inositol, IRE1 (también conocida como ERN1), capaz de activar a HAC1, un factor de transcripción que estimula la expresión de genes involucrados en el plegamiento proteico y la secreción de proteínas (Cox, J. S. & Walter, P. A 1996; Travers *et al.*, 2000), la quinasa pancreática de RE (PERK; también conocida como EIF2AK3) (Hetz, 2012; Harding *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1998) y el factor de transcripción activador 6 (ATF6) (Haze *et al.*, 1999). La rama de IRE1 es la mejor conservada a través de la evolución, y contiene una proteína de unión XBP1 (X-box-binding protein 1), que es homóloga a HAC1 (Yoshida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Calton *et al.*, 2002). En ausencia de estrés de retículo (**Figura 1**), tanto IRE1 como PERK y ATF6 son secuestradas en complejos inactivos junto con proteínas de unión a cadenas pesadas de inmunoglobulinas, BIP (también conocidas como GRP78 y HSPA5) que son chaperonas de RE (Hetz, 2012; Bertolotti *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002; Kimata *et al.*, 2003). La disociación de ellas y BIP constituye el primer paso en la activación de las respuestas de estrés (**Figura 2**). Una hipótesis de inicio a estos mecanismos se basa en que la presencia de proteínas mal plegadas acumuladas en el lumen del RE sea capaz de unir preferencialmente a BIP; quien se disociaría de IRE1, ATF6 y PERK. La disociación de BIP llevaría a la autofosforilación de IRE1 y PERK, y la movilización de ATF6 al Golgi para su activación. La más inmediata de las vías ante un estrés moderado en RE resulta ser la vía que involucra activación de PERK por oligomerización y transfosforilación (Hetz, 2012). También se ha sugerido que el dominio luminal de IRE1 podría interactuar directamente con polipéptidos no plegados, con lo cual su activación sería más directa (Credle *et al.*, 2005; Kimata *et al.*, 2007).

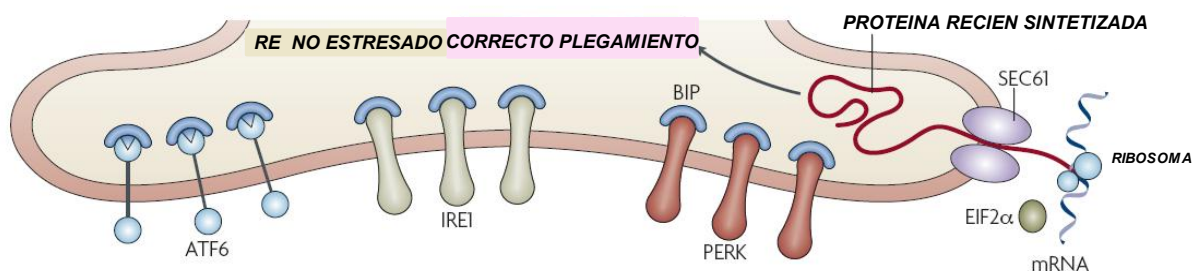


Figura 1. Retículo endoplásmico en homeostasis. Vías de la respuesta a proteínas mal plegadas inactivas en RE. Adaptado de Todd D. *et al.*, 2008.

Vías de activación dependientes de IRE1.

IRE1 existe en dos isoformas: IRE1 α e IRE1 β (Wang *et al.*, 1998). IRE1 α es de expresión ubicua, mientras que IRE1 β se expresa solamente en células epiteliales intestinales, indicando la importancia de la UPR en el mantenimiento de la homeostasis de estas células (Bertolotti *et al.*, 2001; Kaser 2011; Tabas and Ron 2011). Su dominio citoplasmático posee una serin/treonin quinasa, mientras que el dominio C terminal presenta actividad de endoribonucleasa (Wang *et al.*, 1998; Tirasophon *et al.*, 2000). Cuando IRE1 se libera de la unión con BIP (**Figura 2 Ba**), procede a oligomerizarse con otras moléculas IRE1 y autofosforilarse (Bertolotti *et al.*, 2000, Shamu, C. E. & Walter, P. 1996). IRE1 activado puede unirse al factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2), una proteína adaptadora que promueve la activación de JUN N-terminal kinasa (Urano, F. & Wang, X. 2000), a través de la quinasa 1 reguladora de señales de apoptosis (ASK1) (Nishitoh *et al.*, 2002) (**Figura 2 Bd**). Estas señales permitirían la adaptación de las células al estrés iniciando mecanismos de autofagia (Ogata *et al.*, 2006). Estos mecanismos tienden a eliminar organelas dañadas en células sometidas a estrés, por ejemplo por privación de nutrientes (Maiuri *et al.*, 2007). La activación de JNK puede promover apoptosis en células que no pueden revertir la situación de estrés de RE, mediante la activación de caspasa-12 (Yoneda *et al.*, 2001). Por su actividad de endoribonucleasa, IRE1 activada cliva una secuencia de 26 nucleótidos del RNAm de XBP1, en un proceso llamado "splicing de XBP1" (**Figura 2 Bb**) (Yoshida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Calton *et al.*, 2002). Dicho proceso no utiliza los mecanismos tradicionales de splicing de RNAm y su único sustrato reconocido es XBP1. Este splicing genera un cambio en el marco de lectura y la proteína que se genera, XBP1s, presenta un dominio de transactivación en su región C-terminal (Yoshida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Calton *et al.*, 2002) que al trasladarse a núcleo es capaz de unirse a regiones UPR (elementos de la respuesta a proteínas mal plegadas) (**Figura 2 Bc**) y así activar genes relacionados con funciones de biosíntesis y secretoras celulares como, por ejemplo p58IPK, quien a su vez inhibe la actividad de PERK. Dentro de los genes activados se puede citar a EDEM1 (ER degradation enhancer) proteína transmembrana del RE involucrada en reconocer proteínas mal plegadas para ser sustrato de ERAD (ER associated protein degradation); chaperonas de RE como DNAJ4 (HEDJ), p58IPK (o DNAJ3), la proteína de membrana asociada a glicosilación RAMP4, la disulfuro isomerasa P5 (PDI-P5) que facilita la formación de puentes disulfuro (Lee *et al.*, 2003), ERdj3, y el factor de transcripción OBF1, entre otros. Además, XBP1 está involucrado en rutas de biosíntesis de lípidos y biogénesis de RE requeridas para la expansión del RE durante la respuesta al estrés (Shaffer *et al.*, 2004; Sriburi *et al.*, 2004; Hetz, 2012).

Si XBP1 no sufre el splicing antes mencionado se genera una proteína de corta vida media conocida como XBP1u (unspliced), dicha proteína es degradada rápidamente por mecanismos dependientes e independientes de ubiquitina (Lee *et al.*, & Glimcher, L. H. 2003; Tirosh *et al.*, 2006). Ambos productos proteicos con y sin splicing presentan en su dominio N-terminal un cierre de leucinas o bZIP (basic leucine zipper) con función de unión/dimerización al DNA, y un dominio de localización nuclear; el dominio de transactivación existe solo en XBP1s. Se sabe además que XBP1u puede inhibir la traslocación de XBP1s al núcleo o su función de transactivación (Lee *et al.*, & Glimcher, L. H. 2003; Yoshida *et al.*, 2006).

Esta rama de la respuesta de estrés en RE es modulada por ciertas proteínas como por ejemplo BCL-2 (proteína anti-apoptótica), BAX (proteína X asociada a BCL-2) y BAK (antagonista de BCL-2), que interactúan con el dominio citosólico de IRE1 (Hetz *et al.*, 2006). En células con niveles irrecuperables de estrés de RE, la interacción de proteínas pro-apoptóticas de la familia de BCL-2 con IRE1 como por ejemplo la activación de Bax, mecanismos tendientes a la inhibición de la expresión de Bcl-2, la activación de caspasa-12 o también por interacción con TRAF2 y JNK (*jun N terminal Kinasa*) desencadenarían en la activación de ciertas rutas de apoptosis celular, subrayando la importancia que tiene la conexión entre la respuesta a proteínas mal plegadas UPR y ciertos mecanismos de apoptosis (Schönthal, 2012).

Se ha propuesto además que estas proteínas conocidas como pro-apoptóticas tengan efectos anti-apoptóticos bajo condiciones de estrés moderado de RE, y puedan aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas por interacción con IRE1. Con esto, dichas proteínas moduladoras definirían el destino de la célula en función de la magnitud del estrés al que está sometida. Al complejo de IRE1, XBP1 y proteínas asociadas, conocido también como “UPRosoma” se lo considera una plataforma de señalización con capacidad de respuesta rápida al estrés de RE (Hetz & Glimcher, 2008).

Vías de activación dependientes de PERK.

Al liberarse de BIP, PERK activa su dominio quinasa y se inducen mecanismos de transfosforilación y oligomerización sobre otras moléculas PERK (**Figura 2 Ca**). Además PERK inactiva a EIF2 α , factor iniciador de la traducción de proteínas en células eucariotas, con esto detiene la traducción de la mayoría de los RNAm celulares evitando la acumulación de más proteína mal plegada (Harding *et al.*, 1999; Harding *et al.*, 2000). También induce la expresión de ATF4, que no se expresa en las células no estresadas; ATF4 induce la transcripción de genes asociados al metabolismo de aminoácidos y a la respuesta a estrés oxidativo (**Figura 2 Cb**) (Marciniak *et al.*, 2004), y también a la respuesta de estrés en retículo, un ejemplo de esto último sería la inducción de GADD34 (growth-arrest DNA damage gene 34), quien a su vez entre otras actividades, es capaz de desfosforilar a EIF2 α , inhibiendo así los efectos de la respuesta al estrés (**Figura 2 Cc**) (Marciniak *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2001).

Vías de activación dependientes de ATF6.

Los mamíferos poseen dos proteínas homólogas ATF6 α y ATF6 β . ATF6 α es un factor de transcripción transmembrana que contiene un dominio citosólico tipo bZIP y un dominio de localización a Golgi que resulta oculto durante su unión a BIP (Shen *et al.*, 2002). Las señales de estrés en RE inducen la liberación de BIP (**Figura 2 Aa**) y el transporte de ATF6 α a Golgi en donde es clivada secuencialmente por dos proteasas sitio específicas conocidas como site 1 protease (S1P) y site 2 protease (S2P) (**Figura 2 Ab**) (Chen *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2000). El clivaje libera un fragmento de la proteína con función de factor de transcripción (ATF6 α f), dicho fragmento trasloca a núcleo y se une a elementos respondedores a estrés de retículo endoplásmico (ERSE) para inducir la transcripción de varios genes (**Figura 2 Ac**) (Hetz, 2012), incluyendo a EDEM1, p58IPK, CHOP (CCAAT/ enhancer-binding protein homologous protein) (también conocido como GADD153 y DDIT3), XBP1 y chaperonas residentes de RE como GRP94 y BIP, estas últimas son inducidas también por

las otras vías de estrés de RE (Todd *et al.*, 2008; Marzec *et al.*, 2012; Sano and Reed 2013). Si bien ATF6 β es procesado bajo las condiciones de estrés que inducen el procesamiento de ATF6 α y posee el dominio tipo bZIP como éste, parece no estar involucrado en las vías asociadas a la UPR (Lee *et al.*, 2003; Thuerauf *et al.*, 2004).

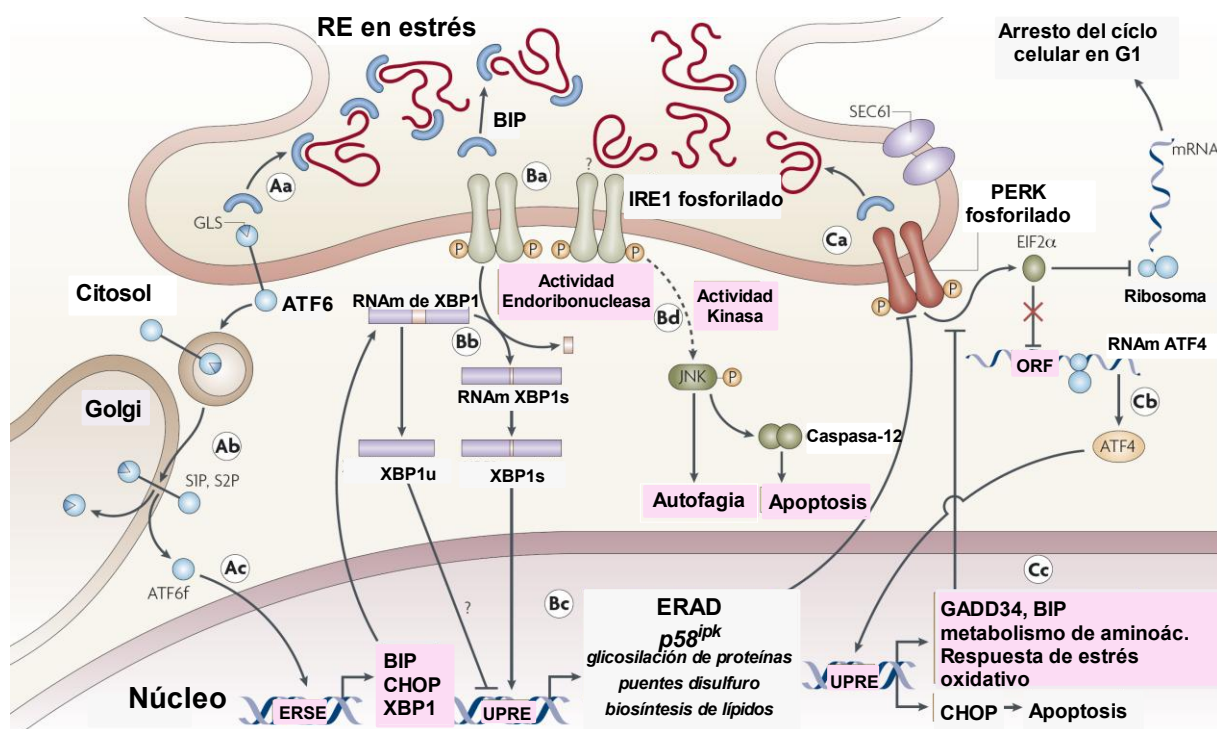


Figura 2. Vías de activación de la respuesta a proteínas mal plegadas en RE. Adaptado de Todd D. *et al.*, 2008.

Interrelación de rutas de la UPR en la célula

Las tres vías de la respuesta de estrés trabajan coordinadamente para contrarrestar los efectos de las proteínas no plegadas o mal plegadas en RE. Las vías se inhiben entre sí y pueden inducir proteínas compartidas. Por ejemplo, existen evidencias de que XBP1 y ATF6 α podrían formar heterodímeros *in vivo* (Yamamoto *et al.*, 2007) y reconocerían secuencias similares en el DNA (Wang *et al.*, 2000). Por otro lado, se sabe que P58^{IPK} regula negativamente la actividad de PERK (Yan *et al.*, 2002; Van Huizen *et al.*, 2003). Existen a su vez diversos mecanismos de retroalimentación entre las diferentes ramas de la respuesta de estrés en la célula que potencialmente podrían servir para distinguir entre el estrés de RE auto-limitado o agudo y el estrés de RE crónico. Los eventos de estrés agudos podrían ocurrir en forma fisiológica en una célula secretora como la β del páncreas (Marciniak *et al.*, 2006) o una célula plasmática; mientras que el estrés crónico representa una situación tóxica o patológica que lleva a la célula a iniciar mecanismos de muerte celular programada. En particular las rutas dependientes de PERK son responsables de esta actividad y lo hacen por intermedio de CHOP (Zinszner *et al.*, 1998).

Entonces, la UPR en su conjunto se encargaría tanto de la degradación de proteínas mal plegadas (mediante la inducción de rutas asociadas a ERAD), como de la inhibición de la síntesis proteica (por fosforilación de EIF2 α mediada por PERK), y también expandiría el tamaño del RE (por inducción de la biosíntesis de lípidos) e induciría la expresión de chaperonas y foldasas (por inducción de genes susceptibles a XBP1). Su trabajo es complejo y activo en la mayoría de las células eucariotas.

Se conocen situaciones que muestran que las anomalías en la UPR de las células afectan a las respuestas inmunes generadas y se asocian con el desarrollo de autoinmunidad. Se han estudiado diferentes enfermedades como por ejemplo la espondilitis anquilosante (Dangoria *et al.* 2002; Smith *et al.*, 2006); diversas miopatías (Acosta-Alvear *et al.*, 2007; Vattemi *et al.*, 2004; Nagaraju *et al.*, 2005) y artritis reumatoidea (Blass *et al.*, 2001; Corrigall *et al.*, 2001), entre otras; en las cuales se ha probado asociación entre fallas en determinados puntos de la UPR y el desarrollo de autoinmunidad.

MICA como marcador de estrés celular en tejido.

El análisis del patrón de marcación observado para MICA en mucosa duodenal, que muestra una expresión más ubicua en el tejido, plantea entonces la posibilidad de un nuevo enfoque respecto a su posible función asociada a patología. Otros autores han mostrado que la expresión de MICA aumentaba en superficie de enterocitos de pacientes celíacos, como parte de los eventos tempranos desencadenados por la respuesta a péptidos derivados de gluten en mucosa duodenal (Hue *et al.*, 2004). Esta nueva localización de MICA en diversos tipos celulares con diferentes patrones; podría estar relacionada tal vez a las condiciones de estrés a las que estaría sujeta la mucosa con enteropatía en EC y/o en otras condiciones inflamatorias intestinales.

Con esta hipótesis decidimos utilizar modelos de estrés celular *in vitro*, con el fin de reproducir los patrones de expresión observados *in situ* para MICA. Al trabajar con líneas celulares en cultivo planteamos, además, la posibilidad de evidenciar si existe modulación de dichos patrones de expresión bajo las diversas situaciones de estrés.

Objetivos

- Evaluar modelos *in vitro* de estrés celular en células Caco-2, THP-1 y Jurkat utilizando diferentes condiciones de estrés.
- Estudiar si la expresión de MICA, como molécula indicadora de estrés celular, se relaciona con estructuras de estrés.
- Analizar la inducción de la expresión de MICA en diferentes condiciones de estrés y en respuesta a IL-15 y p31-43.

Resultados

Estrés en la mucosa duodenal en EC activa. Estudios *in situ* de localización de MICA.

Se han descrito diferentes eventos asociados a la inducción de estrés celular en mucosas con EC; sin embargo, los mecanismos de estrés en particular aún no han sido evaluados en profundidad. En este sentido, y siendo MICA una proteína asociada a la respuesta de estrés; analizamos si su localización intracelular, como hemos visto en varios tipos celulares de mucosa, podía corresponderse con la de otras proteínas involucradas en este tipo de respuesta.

Para evaluar la respuesta de estrés *in situ*, utilizamos cortes de tejido duodenal fijados con paraformaldehído o congelados en matrices de OCT. En ellos observamos, la localización celular de TIA-1, proteína de unión a RNA y conocido marcador de gránulos de estrés. En mucosa duodenal celíaca, utilizando microscopía confocal de fluorescencia, observamos colocación de MICA con TIA-1 en citoplasma de células de diversa morfología (**Figura 3**). Si bien TIA-1 se encontró en muchos casos en núcleo de distintos tipos celulares de la mucosa, también lo hallamos en citoplasma, y consecuentemente en ocasiones lo vimos co-localizado con MICA. Además encontramos células, presentando TIA-1 en núcleo y MICA en citoplasma que, por su morfología, podrían ser células plasmáticas.

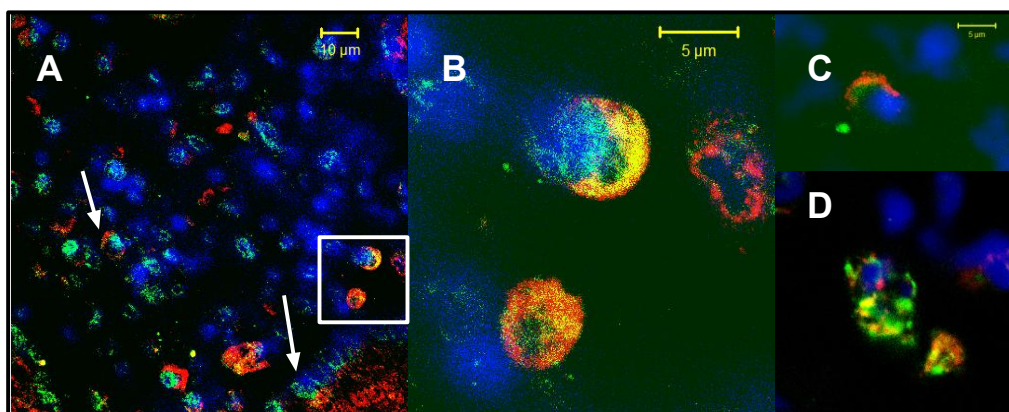


Figura 3. Expresión de MICA en mucosa duodenal en EC activa. Análisis por microscopía confocal de fluorescencia sobre secciones de mucosa duodenal de pacientes celíacos con enteropatía severa al diagnóstico. **(A)** La expresión de MICA (rojo) en citoplasma de diferentes tipos celulares colocaliza con gránulos TIA-1⁺ (verde), en tejido fijado con paraformaldehído. (Magnificación: 40x). **(B)** Imagen aumentada de un sector de (A) mostrando una célula mononuclear con doble marcación. **(C)** y **(D)** colocalización de MICA/B (rojo) y TIA-1 citoplasmático (verde) en células mononucleares de mucosa intestinal congelada en matrices de OCT y posteriormente fijada en acetona (Magnificación: 100x).

Inductores de estrés y expresión de MICA. Estudios *in vitro* en células Caco-2.

Tanto los resultados mostrados en el Capítulo 1 como los referidos previamente, conducen a preguntarnos si es posible que los diferentes patrones de expresión observados para cada tipo celular MICA⁺ se asocien a estructuras generadas en la respuesta de estrés.

Para evaluar el nexo entre la respuesta de estrés y la expresión de MICA decidimos estudiar si dicha expresión podía ser modelada *in vitro* por diferentes inductores conocidos de estrés celular, particularmente estrés térmico (42°C), oxidativo (utilizando arsenito de sodio) y por privación de calcio en retículo endoplásmico (inducido por thapsigargina). Estos modelos se desarrollaron en células Caco-2.

Como hemos mencionado, para evidenciar la respuesta de estrés, se puede evaluar la localización celular de diversas proteínas como, por ejemplo, TIA-1. Particularmente, se conoce que la proteína de unión a RNA TIA-1 presenta, como ya comentamos, una localización nuclear en condiciones basales, y rápidamente se agrega formando pequeñas estructuras citoplasmáticas en respuesta a diversas condiciones de estrés celular (Kedersha *et al.*, 1999). Por lo dicho, TIA-1 resulta entonces útil para evaluar la cinética de formación de gránulos de estrés en la respuesta celular de estrés autolimitado o agudo. De hecho, los gránulos citoplasmáticos identificados como TIA-1⁺, son indicativos de un proceso de estrés celular en curso (Thomas *et al.*, 2009). La respuesta de estrés en los diferentes modelos empleados fue evaluada mediante la localización celular de TIA-1 usando microscopía de fluorescencia.

En nuestros estudios, la incubación de las células en condiciones de estrés térmico (42°C), durante una hora, mostró la presencia de TIA-1 en gruesos agregados citoplasmáticos compatibles con gránulos de estrés (**Figura 4A**).

En condiciones de estrés oxidativo, observamos que las distintas concentraciones del estresor generaban diferentes tipos de agregados citoplasmáticos conteniendo TIA-1; ya que luego de una hora de incubación con arsenito de sodio 500 μM , se observaron los característicos gránulos de estrés TIA-1⁺ en citoplasma (Thomas *et al.*, 2005) (**Figura 4B**), mientras que usando concentraciones de 250 μM se obtuvieron finos agregados citoplasmáticos TIA-1⁺ (**Figura 4C**).

En cuanto al tratamiento con Thapsigargina, probamos la formación de gránulos de estrés TIA-1⁺, tal como refieren otros autores (Loschi *et al.*, 2009); incubando las células durante diferentes tiempos. Luego de una hora (**Figura 4D**) y tres horas (**Figura 4E**) de incubación con el estresor, observamos traslocación de TIA-1 a citoplasma y distribución de la proteína en finos agregados citoplasmáticos compatibles con lo observado bajo las condiciones de estrés oxidativo con arsenito de sodio 250 μM .

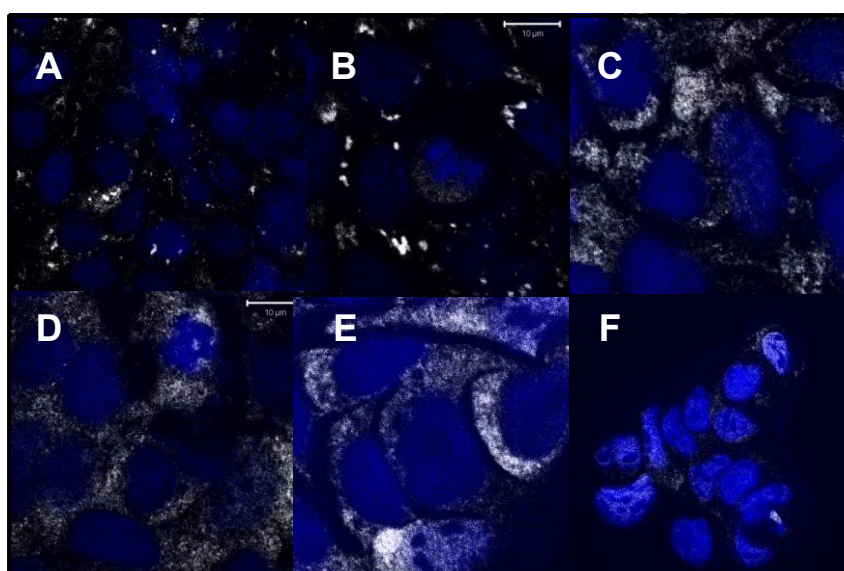


Figura 4. Inducción de estrés celular en células Caco-2. Análisis por microscopía confocal de fluorescencia de células Caco-2 tratadas según: **(A)** estrés térmico (1 hora, 42°C), **(B)** arsenito de sodio 500 μM , **(C)** arsenito de sodio 250 μM , **(D)** estrés de retículo endoplásmico inducción de 1 hora, **(E)** estrés de RE inducción de 3 horas, **(F)** células no tratadas. TIA-1 (blanco), los núcleos marcados con DAPI (azul). Magnificación: 100x.

Habiendo entonces caracterizado las condiciones de estrés *in vitro* en células Caco-2, estudiamos la expresión de MICA en los distintos modelos mediante citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 5**, las células no tratadas mostraron expresión de MICA fundamentalmente en citoplasma, no hallándose altos niveles de expresión de las proteínas en superficie. Mediante la misma técnica no detectamos cambios en los niveles de expresión de las células sometidas a tratamiento térmico (1 hora, 42°C).

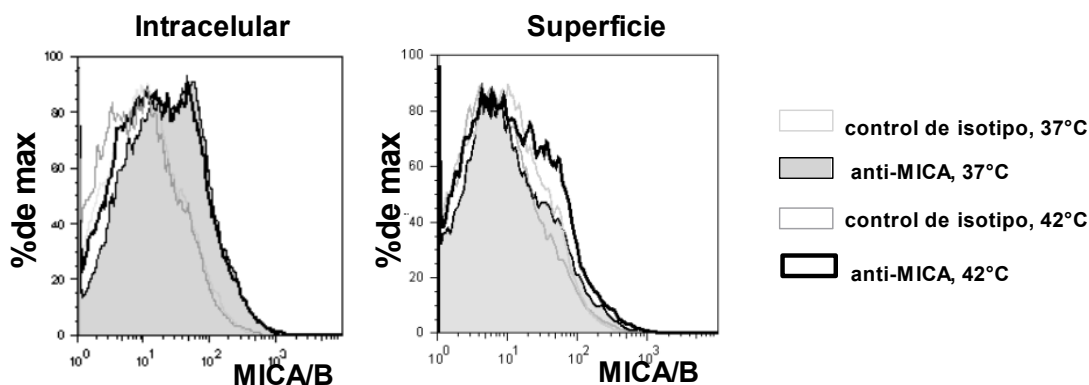


Figura 5. Expresión citoplasmática de MICA en células Caco-2 evidenciada por citometría de flujo. Las células fueron sometidas o no a estrés térmico (1 hora a 42°C), y luego fueron marcadas con el anticuerpo anti-MICA, D7, o el control isotipo. Se realizaron marcaciones de superficie y posterior a la permeabilización para evidenciar la localización citoplasmática mediante citometría de flujo.

Si bien el tratamiento térmico no mostró aumento de expresión de MICA cuando el análisis se realizó mediante citometría de flujo; el estudio cinético de expresión por microscopía de fluorescencia, en células Caco-2 sometidas a estrés térmico durante diferentes períodos de tiempo, mostró redistribución de MICA hacia grandes agregados citoplasmáticos (**Figura 6**). El tratamiento a 42°C mostró que la redistribución no es inmediata ya que a los 10min de incubación no se observan cambios con respecto a las células sin tratar. Luego, la reorganización granular es gradual, hallándose algunas células con agregados positivos a los 30 min. A la hora de exposición al estímulo, la imagen predominante fueron células con agregados citoplasmáticos gruesos MICA⁺, en general de 1 a 2 por célula. Esta observación coincide con lo encontrado en estrés oxidativo y de retículo endoplásmico en el pico de la respuesta, (1hora, para ambas condiciones). En el caso de estrés de RE, los agregados se mantienen luego de 3 horas de estímulo.

El patrón de expresión de MICA en las células no tratadas fue siempre citoplasmático y difuso sin presencia de agregados (**Figura 6**). El número de agregados MICA⁺ por célula fue variable, aunque las células conteniendo uno o dos agregados citoplasmáticos fueron las más frecuentes en todas las condiciones de estrés estudiadas.

Luego, evaluamos si la expresión de MICA observada en los modelos de estrés se asociaba a gránulos de estrés. Se realizaron estudios de colocalización de MICA y TIA-1 en células Caco-2 sometidas a los diferentes modelos de estrés celular. Observamos entonces que, si bien la expresión de MICA resultó citoplasmática y en agregados como ya lo describimos, las estructuras granulares MICA⁺ halladas durante las diferentes respuestas de estrés no colocalizan con el marcador de gránulos de estrés TIA-1 (**Figura 7**).

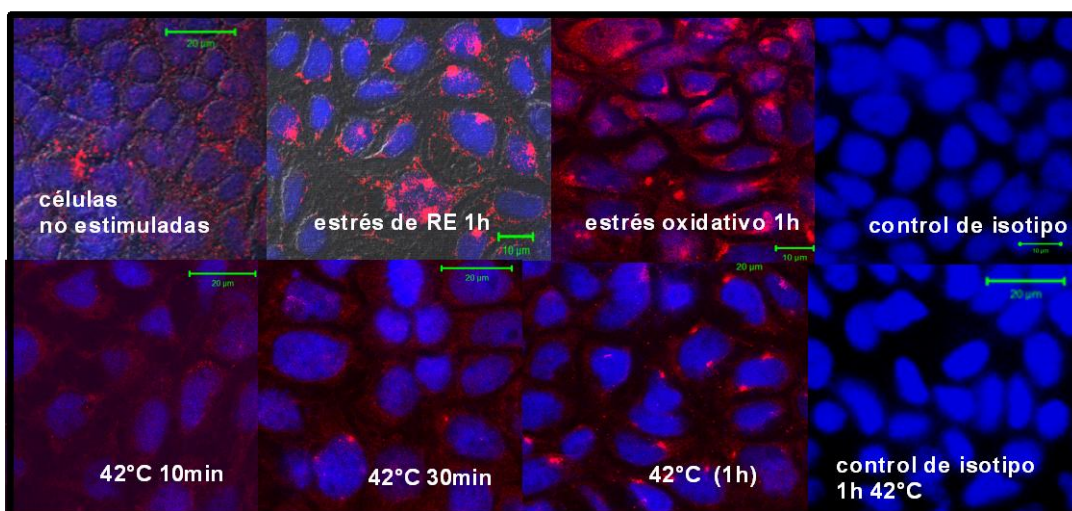


Figura 6. Patrón de expresión de MICA en células Caco-2 bajo diferentes protocolos de estrés celular. Microscopía confocal de fluorescencia de células Caco-2 tratadas en las condiciones indicadas en la figura. MICA (rojo). Los núcleos marcados con DAPI (azul). Magnificación 100x.

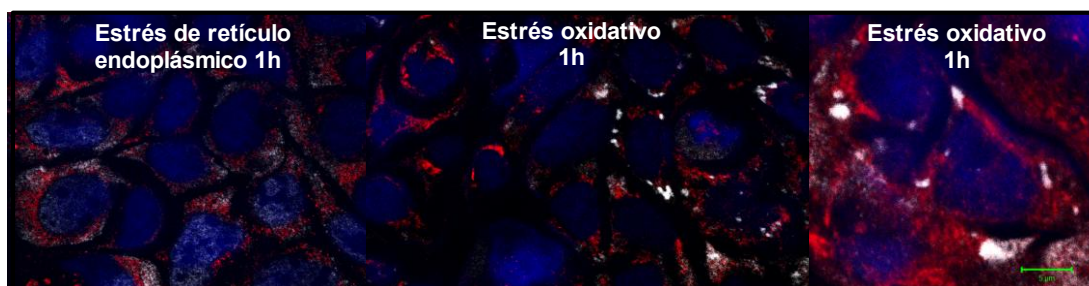


Figura 7. Análisis de expresión de MICA y TIA-1 bajo condiciones de estrés de retículo endoplásmico o estrés oxidativo. Microscopía confocal de fluorescencia en células Caco-2 tratadas en las condiciones indicadas en la figura. MICA/B (rojo), TIA-1 (blanco). Núcleos marcados con DAPI (azul). Magnificación 100x.

Con el fin de evaluar si las condiciones de estrés modificaban la actividad transcripcional de MICA se empleó RT-PCR cuantitativa en muestras de RNA total de células Caco-2 incubadas con arsenito de sodio (500 μ M), thapsigargina (1 μ M) y altas temperaturas (42°C). Si bien se observó un aumento de expresión en el pico de la respuesta de estrés utilizando arsenito de sodio (1h), en ningún caso las diferencias resultaron estadísticamente significativas. En este modelo, los resultados sugieren que no existe síntesis *de novo* de MICA en el inicio de una respuesta de estrés (**Figura 8**).

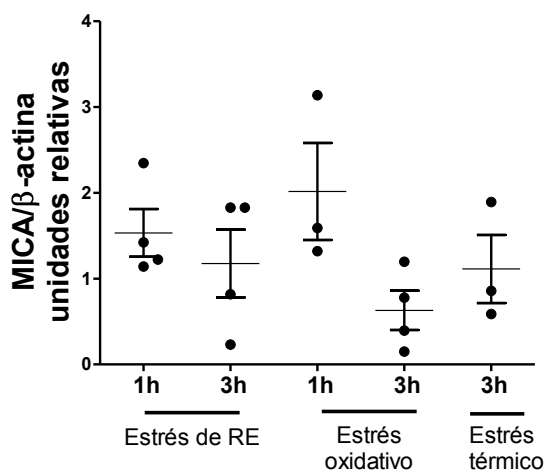


Figura 8. Expresión relativa de RNAm de MICA en células Caco-2 sometidas a diferentes condiciones de estrés. Análisis por RT-PCR cuantitativa sobre muestras de RNA total de células Caco-2 incubadas con arsenito de sodio (500 μ M) (estrés oxidativo), thapsigargina (1 μ M) (estrés de retículo) y estrés térmico (42°C). Los resultados se expresaron como niveles relativos referidos al housekeeping gene, β -actina, y al control no tratado. No se observaron diferencias significativas de expresión entre los distintos grupos analizados. (Test de Mann Whitney).

Estudios in vitro en células Jurkat.

Previamente hemos descrito la expresión de MICA en linfocitos T tanto del compartimento intraepitelial como de la *lamina propria*, en mucosa intestinal con histología normal o con enteropatía. También mostramos su mayor frecuencia, por un lado en el compartimento intraepitelial en pacientes con enteropatías leves y moderadas; y por el otro en la *lamina propria* de pacientes con enteropatías tanto leves como severas. A su vez, hemos observado *in situ* la colocación de MICA con el marcador de gránulos de estrés TIA-1 en mucosa intestinal en pacientes celíacos. Podemos inferir entonces, que la expresión intracelular de MICA en linfocitos T sería parte de la respuesta de estrés celular que acompañaría al contexto de estrés de la mucosa con enteropatía. Con el fin de evaluar esta hipótesis, estudiamos la modulación de la expresión de MICA en células Jurkat, como modelo de linfocitos T, bajo las diferentes condiciones de estrés utilizadas anteriormente.

Observamos que las células Jurkat sin tratar no presentan expresión de MICA en superficie, pero ésta se indujo rápida e intensamente bajo condiciones de estrés térmico (**Figura 9A**). Al igual que lo observado en células Caco-2, MICA se encontró fundamentalmente expresado intracelularmente. Sus niveles de expresión fueron similares tanto a 37°C como a 42°C (**Figura 9A**). El tratamiento con thapsigargina, logró una ligera inducción de la expresión intracelular de MICA (**Figura 9B**); mientras que el tratamiento con arsenito de sodio generó mayor expresión de MICA, tanto en la membrana como en el citoplasma de las células tratadas (**Figura 9C**). En consecuencia, podemos observar que la expresión de MICA puede ser inducida en células Jurkat, y que los niveles varían de acuerdo al ambiente estresor al que sometamos a este modelo de linfocito T.

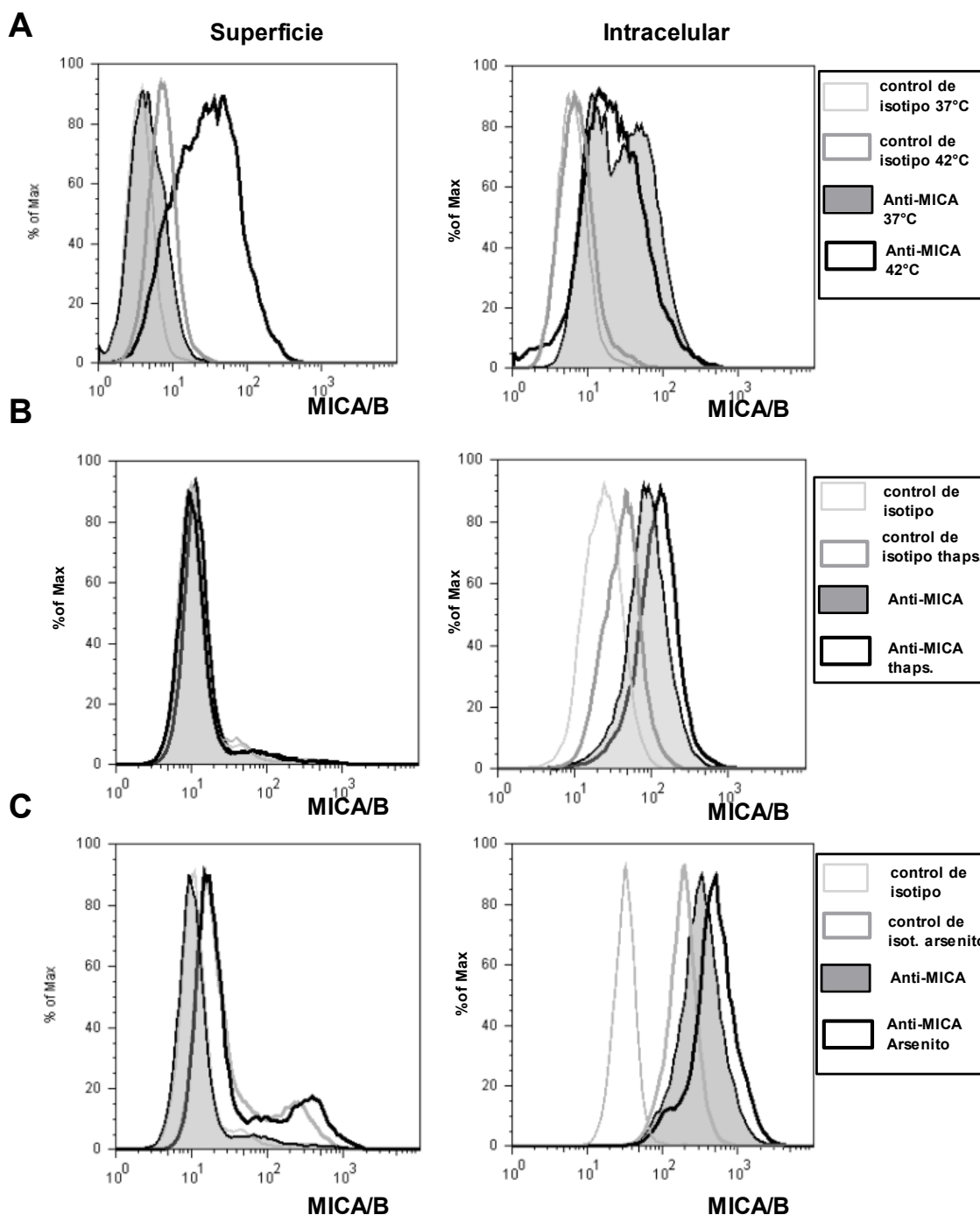


Figura 9. Análisis de la expresión de MICA por citometría de flujo en células Jurkat sometidas a distintas condiciones de estrés. Las células Jurkat fueron incubadas durante 24h bajo diferentes condiciones de estrés. **(A)** Tratamiento térmico (42°C), **(B)** estrés de retículo endoplásmico (thapsigargina 1 μM) y **(C)** estrés oxidativo (arsenito de sodio 500 μM). La expresión de MICA en superficie y en el compartimento intracelular fue evaluada por citometría de flujo. Se empleó un control de isotipo, y se comparó con células sin tratar.

IL-15 y el péptido de gliadinas, p31-43, modulan la expresión de MICA.

a.- Inducción de MICA en células Jurkat.

Además de evaluar la expresión de MICA en los modelos de estrés descritos anteriormente, y dada la alta expresión observada en linfocitos CD7⁺ tanto del compartimento intraepitelial como de *lamina propia*, nos interesó conocer si dos estímulos (IL-15 y el péptido p31-43), modulan la

expresión de MICA en linfocitos T. Como hemos mencionado, se ha descrito que tanto IL-15 como p31-43 inducen diferentes mecanismos de la respuesta innata que podrían inducir la expresión de MICA. En particular, se ha propuesto que IL-15 sería uno de los principales inductores de MICA en mucosa intestinal en EC (Hue *et al.*, 2004; Meresse *et al.*, 2006).

Con este fin, células Jurkat, fueron incubadas por 24 horas con el péptido de α -gliadinas p31-43, IL-15 o una combinación de ambos. También empleamos un péptido de secuencia no relacionada (PNR) como control. No se observó expresión de MICA en superficie bajo ninguna de las combinaciones de estimulación (**Figura 10A**). De manera coincidente con lo descrito en estudios de microscopía confocal en secciones de tejido, observamos expresión intracelular de MICA. Esta expresión se observó en condiciones basales, y fue incrementada cuando las células Jurkat se estimularon con el péptido p31-43, IL-15, o con una combinación de ambos. No se observaron efectos sinérgicos en el cultivo con los dos estímulos juntos (**Figura 10B**).

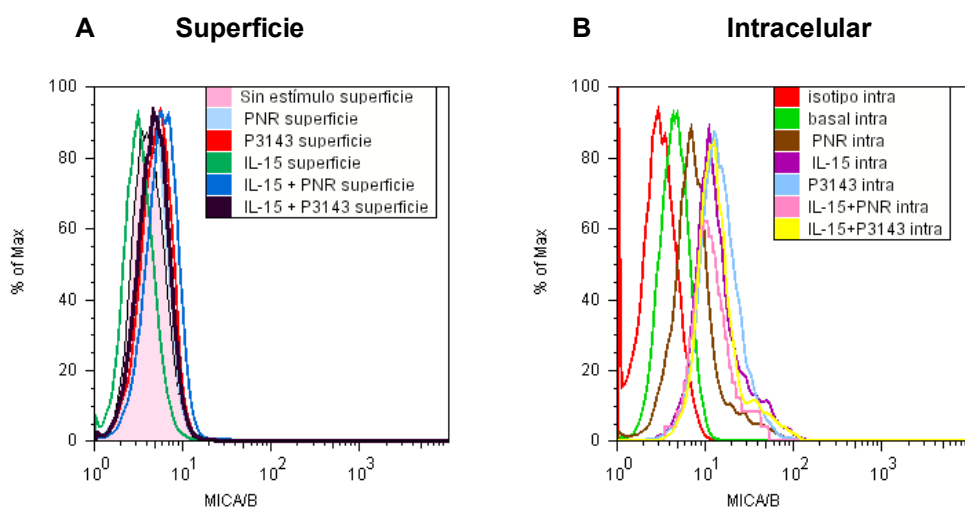


Figura 10. IL-15 y/o p31-43 inducen la expresión intracelular de MICA en células Jurkat. Células Jurkat fueron incubadas durante 24 hs con IL-15 (50ng/mL), p31-43 (100 μ g/mL), una combinación de ambos, y como controles células incubadas en medio de cultivo o con un péptido no relacionado (PNR). Luego, las células se marcaron con el anticuerpo D7 o un control de isotipo y se analizaron mediante citometría de flujo (**A**) marcación de superficie (**B**) marcación intracelular.

b.- Inducción de MICA en células THP-1.

Habiendo observado que algunas células CD68⁺ HAM56⁺, en la mucosa duodenal en enteropatía expresan MICA, nos interesó evaluar *in vitro* (células THP-1, modelo de monocito/macrófago) si la expresión de MICA puede ser modulada por IL-15 y/o p31-43. Se evaluó la inducción de RNAm de MICA mediante RT-PCR cuantitativa en células estimuladas con p31-43 o IL-15. Se observó una tendencia hacia mayores niveles de RNAm de MICA que no llega a ser significativa en células incubadas con p31-43. En cambio, sí fue relevante que la incubación con IL-15 indujo, en forma significativa, la expresión de MICA comparado con las células no estimuladas ($p=0,03$ Mann-Whitney Test) (**Figura 11**). No observamos aumento de la expresión de MICA con la incubación con flagelina (1 μ g/ml), o poly I:C (100 μ g/ml), como conocidos inductores de respuesta mediada por receptores de la respuesta innata (no mostrado).

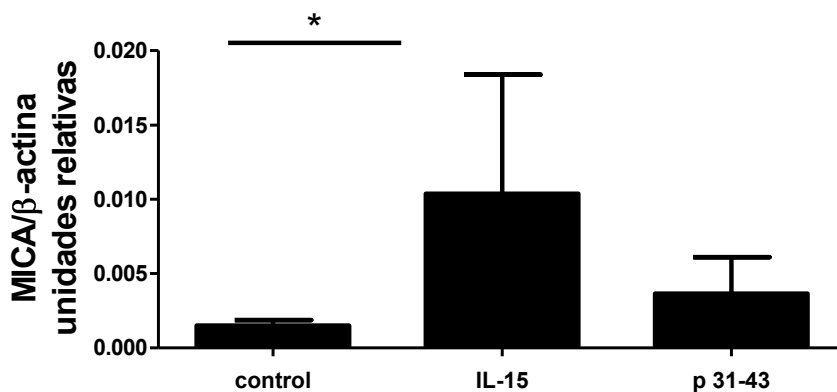


Figura 11. IL-15 induce MICA en células THP-1. Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de RNAm de MICA en células THP-1 incubadas durante 3 horas con IL-15 (50ng/mL) o p31-43 (100µg/mL). Los resultados se expresan como Unidades Relativas referidas al housekeeping gene β-actina. Como control se utilizaron células no estimuladas. Mann-Whitney Test, (*) p= 0,0284.

c.- Inducción de MICA en intestino delgado

Como hemos comentado previamente, estudios por inmunohistoquímica mostraron que la expresión de MICA en mucosa duodenal de pacientes celíacos en dieta libre de gluten puede inducirse por incubación con IL-15 o el péptido de gliadinas p31-43 (Hue *et al.*, 2004; Maiuri *et al.*, 2003), dos inductores que tienen un rol clave en el desarrollo de EC.

Habiendo probado que, *in vitro*, los estímulos IL-15 y p31-43 inducen la expresión de MICA en células Jurkat y THP-1, decidimos estudiar el efecto que producen estos estímulos a nivel transcripcional sobre el gen MICA en mucosa duodenal de pacientes pediátricos celíacos al diagnóstico y controles. Se emplearon cuatro piezas de biopsias para incubación con: p31-43, IL-15, ambos y una pieza como control (no estimulada). No observamos inducción de MICA mediante RT-qPCR luego de 3hs de incubación en ninguna de las condiciones testeadas (**Figura 12**). Tampoco luego de 24 horas de incubación (no mostrado).

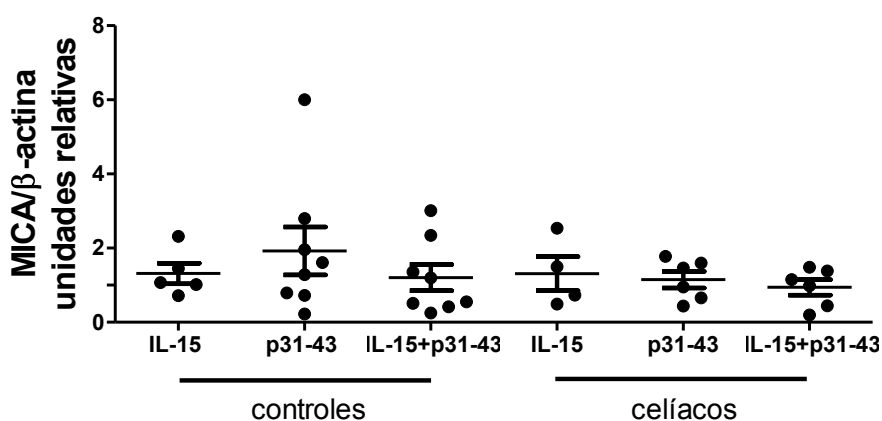


Figura 12. Expresión de MICA en mucosa intestinal estimulada con IL-15 y/o p31-43. Análisis por RT-qPCR del nivel de inducción de MICA relativo a β-actina en biopsias duodenales de controles no celíacos (n=8) y celíacos al diagnóstico (n=6), incubados durante 3 hs con IL-15 (50 ng/mL) y/o p31-43 (100 µg/mL). Los resultados de las incubaciones con estímulos se refirieron a la muestra del mismo individuo no estimulada. (p=n.s., Mann-Whitney Test).

Estas observaciones contradicen el modelo de inducción de MICA en duodeno por los estímulos de IL-15 o p31-43. Sin embargo, debemos considerar que la pieza de biopsia de EC activa

está sometida a un proceso de largo desarrollo, donde los mecanismos de inducción pueden estar ya sobreactivados. Por lo tanto, el estudio de estimulación *ex vivo* no prueba, en nuestro caso, la inducción de RNAm de MICA en el tejido, pero claramente existen fenómenos activos asociados a la regulación de su expresión a nivel de proteína ya sea en relación a su localización y en especial a la asociación con estructuras de estrés.

Discusión

Diferentes estudios realizados en mucosa de intestino delgado, células aisladas de mucosa intestinal o en líneas celulares epiteliales apoyan la idea de la existencia de un nexo entre estrés celular y daño en la mucosa intestinal en EC activa. Por ejemplo, se ha encontrado un aumento del nivel de prostaglandinas E2 (PGE2) en duodeno de pacientes celíacos no tratados, que junto con una disminución de los niveles de antioxidantes, como la enzima glutatión peroxidasa y reductasa, y consecuentemente de glutatión reducido (GSH) (Ferretti *et al.*, 2012; Luciani *et al.*, 2010), evidencian una situación de estrés oxidativo en mucosa. Sumado a esto, se encontró que la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), cuya expresión es constitutiva en enterocitos duodenales, presentaba mayor actividad en EC activa (Ferretti *et al.*, 2012). De hecho se le adjudica participación directa a péptidos derivados de gliadinas, particularmente el péptido p31-43, en la inducción de estrés oxidativo mediante producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno, (ROS y RNS, respectivamente) (Rivabene *et al.*, 1999). Además, los niveles aumentados de ROS, generados mediante un mecanismo dependiente de transglutaminasa 2 (TG2), llevarían a la disminución de la expresión de PPAR γ , y con esto a una imposibilidad de controlar el proceso inflamatorio (Luciani *et al.*, 2010). En enterocitos de mucosa duodenal en EC activa se ha descrito además que la acumulación en lisosomas de péptidos derivados del procesamiento de gluten, tales como el p31-43; induciría mecanismos de estrés celular (Luciani *et al.*, 2010). Estas observaciones nos llevan a postular que la existencia de estrés celular en mucosa duodenal formaría parte del conjunto de mecanismos inductores de daño actuantes en las primeras etapas y en la cronicidad de la enfermedad.

Por otro lado, un estudio realizado sobre células Caco-2 (Caputo *et al.*, 2012) muestra la inducción de estrés de retículo endoplásmico por incubación con el péptido p31-43. Dicho péptido logra movilizar los depósitos de calcio de RE, lo que aumenta los niveles de expresión y la actividad de TG2. Estas observaciones sugieren que las vías de estrés de retículo endoplásmico podrían participar tanto en eventos tempranos como en etapas crónicas de la enteropatía.

Por estas razones, nos interesó evaluar la expresión y localización de la proteína de unión a RNA, llamada TIA-1, un marcador asociado a procesos de estrés celular en mucosa intestinal. Como ya comentamos, TIA-1 es utilizada como marcador de gránulos de estrés (Thomas *et al.*, 2009) debido a que trasloca, junto con otras proteínas, del núcleo al citoplasma formando estructuras granulares transitorias presentes en condiciones de estrés agudo, los cuales son focos de silenciamiento de RNA generados en las células como parte de una respuesta protectora.

El estudio *in situ* de la expresión de TIA-1 en mucosa duodenal celíaca mediante microscopía confocal, y su colocalización con MICA en gránulos citoplasmáticos en células mononucleares, nos evidencia la presencia de estrés celular en mucosa con enteropatía. Por lo tanto, indicaría que, *in vivo*, MICA se encuentra en gránulos de estrés en tejido con enteropatía (**Figura 3**). Por otro lado, los estudios en células Caco-2, en tres condiciones de estrés, mostraron que es posible inducir gránulos de estrés en células modelo de enterocito (**Figura 4**).

Utilizando citometría de flujo probamos que MICA se expresa fundamentalmente en el compartimento intracelular en células Caco-2 (**Figura 5**). El tratamiento de las células con thapsigargina, arsenito de sodio y altas temperaturas (42°C) condujo a la formación de gránulos

gruesos citoplasmáticos MICA⁺ (**Figura 6**) similares a los observados *in situ* en los enterocitos de cortes histológicos con enteropatía severa mostrados previamente (**Capítulo 1, Figura 11**).

A su vez, el estudio de condiciones de estrés térmico (**Figura 6**) mostró que los gránulos MICA⁺ se reorganizan en tiempos cortos de tratamiento, al igual que lo observado en condiciones de estrés de retículo y estrés oxidativo.

Los estudios de PCR cuantitativa mostraron que bajo las diversas condiciones de estrés evaluadas no se induce significativamente la expresión de MICA a nivel de RNAm, aunque existe cierta tendencia a mayores expresiones durante el máximo de la respuesta de estrés oxidativo y de retículo endoplásmico (**Figura 8**). Estos resultados sugieren que no se observa una síntesis de novo si no que fundamentalmente la proteína preexistente se relocaliza en función de los cambios que ocurren en el medio.

Los estudios de colocalización de TIA-1 con MICA en los diferentes modelos de estrés celular evaluados en células Caco-2 nos permiten concluir que el proceso de estrés conduce a secuestrar a MICA en estructuras citoplasmáticas de tipo granular que se inducen bajo situaciones de estrés celular (**Figura 7**). En base a esto consideramos que la agregación de MICA observada *in vitro* correspondería, tal vez, a otro tipo de estructura diferente a los gránulos de estrés pero seguramente asociada a la respuesta de estrés.

Estos resultados nos permiten inferir que los agregados MICA⁺ observados en enterocitos de pacientes celíacos no corresponden a gránulos de estrés. Sin embargo, no podemos descartar otras localizaciones intracelulares como RE o aparato de Golgi, ni otras estructuras granulares transitorias debidas a la respuesta de estrés como, por ejemplo, los agresomas o los cuerpos de procesamiento.

Podemos concluir de las observaciones realizadas en tres modelos diferentes de estrés celular, que bajo condiciones de estrés, MICA se redistribuye en estructuras granulares gruesas peri y/o supranucleares, tanto en pacientes celíacos al diagnóstico (con ingesta normal de gluten); como, en menor medida, en pacientes en dieta libre de gluten. Nuestros resultados sugieren entonces que, en enterocitos, cualquier respuesta genérica de estrés llevaría a la redistribución de MICA en gránulos.

Situaciones similares a esta fueron descritas para otros sistemas. Por ejemplo, la expresión heteróloga del CFTR (regulador de conductancia transmembrana, que sufre una mutación puntual llamada $\Delta F508$ (Ward, C.L. *et al.*, 1995) y se asocia a la enfermedad "fibrosis quística", lleva a la formación de agregados insolubles en SDS que se acumulan en un único agresoma yuxtanclear que generalmente se encuentra en una indentación de la membrana nuclear que colocaliza con marcadores de centrosomas (Johnston *et al.* 1998; Wigley *et al.*, 1999).

Entre otros sistemas de agregados de proteína mal plegada, podemos mencionar a proteínas de membrana que, en situaciones de estrés, se observan en localizaciones pericentriolares, entre los cuales se citan presenilina 1 (Johnston *et al.*, 1998), proteína periférica de mielina PMP22 (Notterpek *et al.*, 1999), entre otros (García-Mata *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 2000). De hecho, se ha documentado la migración de pequeños agregados generados en la periferia celular en trayectorias rectas o curvilíneas en el citoplasma celular hacia el agresoma a una velocidad de 0.32 mm/min (García-Mata *et al.*, 1999).

También, es cierto que al estar el aparato de Golgi localizado alrededor del centro organizador de microtúbulos de la célula, es frecuente confundir la localización de proteínas mal plegadas en agrosomas con una localización en dicha organela.

La observación de agregados pericentriolares de proteínas no es algo nuevo; en células de mamífero sometidas a estrés térmico (Vidair *et al.*, 1996) o infección viral (Brown *et al.*, 1994), se ha observado acumulación de HSP70 en el centrosoma acompañada por otras proteínas (Vidair *et al.*, 1996; László *et al.*, 1991). Se ha observado que, en células no sometidas a estrés, el 1% de los proteasomas celulares catalíticamente activos se asocian al centro organizador de microtúbulos (Wigley *et al.*, 1999).

Se conoce la actividad de proteasomas asociados al centro organizador de microtúbulos en eventos como la división celular y el control de etapas del ciclo celular (Hershko, A. 1997). A estas funciones se les suma la de remover proteínas agregadas que se encuentran en el citosol para evitar que interfieran con las funciones celulares. Se ha planteado, además, que el hecho de centralizar los agregados proteicos en una única región celular facilitarfa su conexión con rutas de autofagia. La autofagia es el principal proceso por el cual los componentes citoplasmáticos, incluidos ribosomas y organelas, son degradados. Las partículas destinadas a este fin son envueltas en membrana celular para formar autofagosomas, los cuales maduran a lisosomas (Mortimore *et al.*, 1996). La autofagia es inducida en las células por privación de aminoácidos y por estrés. Si bien se puede relacionar la formación de agrosomas con procesos de autofagia, no existe evidencia directa de que ambos procesos estén realmente conectados.

Ya hemos descrito la expresión de MICA en linfocitos T en mucosa duodenal de pacientes celíacos y controles (**Capítulo 1**). También hemos mostrado el aumento de la expresión de MICA en linfocitos del compartimiento intraepitelial en enteropatías leves y moderadas, y en linfocitos de la *lamina propria* en todos los casos de enteropatía estudiados (**Figuras 15 y 18, Capítulo 1**). Hemos también observado colocalización de la expresión de MICA y TIA-1 en duodeno en enteropatía, en EC activa, en células mononucleares con morfología compatible con linfocitos T (**Figura 3**).

Con el fin de profundizar el estudio, hemos empleado la línea celular Jurkat (como modelo de linfocitos T). Resultados de bibliografía, han mostrado la expresión constitutiva de MICA tanto a nivel de RNAm como de proteínas, y de otras proteínas inducibles por estrés como las ULBP1 y 2 en células Jurkat (Weiss-Steider *et al.*, 2011). En este sentido, nuestros resultados coinciden con lo descrito sobre la expresión constitutiva e intracelular de MICA en dichas células. También observamos sobreexpresión asociada a estrés, con resultados variables de acuerdo al estresor utilizado (**Figura 9**). Entonces, las imágenes de fluorescencia obtenidas, sugieren que *in vivo* MICA podría alojarse en organelas como retículo endoplásmico o aparato de Golgi y no descartan localizaciones propias de la respuesta de estrés como, por ejemplo, los agrosomas (**Capítulo 1, Figuras 11, 15 y 17**).

Empleando distintos modelos de estrés, las condiciones de privación de calcio en retículo endoplásmico y estrés oxidativo (**Figura 9**) parecen reflejar mejor la inducción intracelular observada *in situ* (**Capítulo 1, Figuras 11, 15 y 17**).

También observamos un aumento de expresión de MICA en células Jurkat post estimulación con IL-15 y/o p31-43 (**Figura 9**), en concordancia con la inducción que podría observarse en los linfocitos T de mucosa intestinal expuesta a péptidos de gliadinas y altos niveles de IL-15 como

ocurre en EC activa. Aunque la regulación de la expresión de MICA es compleja e involucra diferentes vías de señalización, entre otras al factor de transcripción NF κ B (Molinero *et al.*, 2004), se ha descrito que IL-15, pero no IFN γ ni TNF α , inducen la expresión de MICA en células T de sangre periférica (Molinero *et al.*, 2006).

Habiendo observado que algunas células de linaje monocito/macrófago (CD68⁺ HAM56⁺) en la mucosa duodenal en enteropatía expresan MICA, nos interesó evaluar *in vitro* (células THP-1) si la expresión de MICA puede ser modulada por IL-15 y/o p31-43. Se conoce que la línea celular THP-1 expresa constitutivamente MICA, y también puede secretarla (Weiss-Steider *et al.*, 2011).

Nuestros estudios sobre células THP-1 (modelo de línea monocito/macrófago) mostraron inducción de MICA con IL-15 (**Figura 11**) sugiriendo que este tipo celular respondería a estímulos asociados a la patogenia de EC. Esto correlacionaría con lo observado en los estudios por microscopía de fluorescencia en secciones de mucosa duodenal de pacientes celíacos sin tratar (**Capítulo 1, Figura 17 vi**).

Así como describimos la ausencia de inducción significativa de MICA (a nivel de RNAm) en biopsias duodenales pediátricas de pacientes celíacos al diagnóstico (**Capítulo 1, Figura 7**); la incubación de piezas de biopsias con IL-15 y/o p31-43, tampoco evidenció cambios significativos en la actividad transcripcional de MICA en mucosa intestinal de celíacos sin tratar ni de los controles (**Figura 12**).

En trabajos previos se ha descrito la inducción de MICA por el péptido p31-43 de manera dependiente de IL-15, en biopsias intestinales de pacientes celíacos en dieta libre de gluten (Hue *et al.*, 2004; Maiuri *et al.*, 2003). Por el contrario, en nuestro trabajo hemos empleado muestras duodenales de pacientes celíacos sin tratar, que poseen una lesión mucosa de larga evolución. Pensamos que, en estos casos, los mecanismos inflamatorios ya se encuentran sobreactivados y no es posible lograr una estimulación adicional que induzca cambios en los niveles de MICA. En este sentido, IL-15, en conjunto con otras citoquinas sobreexpresadas en mucosa intestinal de pacientes celíacos sin tratamiento, llevaría tal vez a un estado de no respuesta debido a la saturación de vías de señalización o a bloqueos de expresión por mecanismos regulatorios. En este contexto, destacamos que IFN γ , la citoquina más relevante y abundante en mucosa intestinal en EC activa, regula negativamente la expresión de MICA en células de melanoma (Schwinn *et al.*, 2009). Es posible entonces que diferentes circuitos regulatorios intervengan como control de la expresión de MICA en la mucosa intestinal en EC activa.

Otra interpretación de este resultado podría postular que, si bien la expresión de MICA puede ser muy intensa, se limitaría a ciertas poblaciones celulares presentes en el tejido y tal vez los cambios en los niveles no alcancen a ser detectados frente al RNAm total proveniente del resto del tejido. Sin embargo, nosotros probamos que en mucosa con EC, MICA se expresa en muchos tipos celulares y además, esas células muchas veces forman acúmulos importantes con expresión de MICA. Desde esta perspectiva en la cual MICA es un ligando de estrés sensible a las condiciones del ambiente y más ubicuo que lo que se asumía en mucosa duodenal con enteropatía, su sobreexpresión podría ser utilizada como mecanismo de control de poblaciones en un entorno inflamatorio como el de la mucosa celíaca en actividad, como planteamos en el capítulo 1. Pero no debemos dejar de lado el hecho de que esta mucosa presenta signos de un gran estrés tanto oxidativo como de RE. En este sentido, podríamos estar observando células con enormes cantidades

de MICA concentradas en organelas como RE o Aparato de Golgi, con un arresto de la transcripción del gen, niveles funcionales de la proteína en membrana y una relocalización de MICA sobreproducida y mal plegada en estructuras de estrés por mecanismos activos de la UPR tendientes a rescatar a enterocitos y otras células de la apoptosis.

Las vías que se ponen en juego en la respuesta a proteínas mal plegadas son tanto de adaptación y supervivencia como pro-apoptóticas. En casos con niveles de estrés sub-letal y crónico, las células se adaptan aumentando la expresión de chaperonas en RE. Además la estabilidad de los RNAm y proteínas implicadas en vías de supervivencia resulta mayor a los de vías pro-apoptóticas, logrando muchas veces el desbalance de estas vías opuestas disparadas en forma simultánea en favor de la supervivencia (Rutkowsky *et al.*, 2006; Schöntal, 2012). Esta observación estaría de acuerdo con la hiperproliferación de criptas y el gran infiltrado celular observado en EC.

Conclusiones

En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de MICA es un indicador de la respuesta de estrés generada en el proceso crónico de la enteropatía en EC activa. Por lo tanto, aunque originalmente MICA se asoció al mecanismo de inducción de daño directo vía NKG2D en enterocitos de la mucosa con enteropatía, nuestros estudios revelan que MICA podría tener un rol más amplio en la mucosa intestinal.

Hemos observado que los cambios en intestino delgado debidos al proceso de daño en EC afectan la expresión de MICA en enterocitos, así como también en otros tipos celulares como linfocitos T y B, que no habían sido descritos anteriormente.

Es así que la expresión de MICA en este conjunto variado de células podría ser parte de mecanismos fisiológicos de recambio celular normal o autolimitación voluntaria de poblaciones en expansión en ambientes expuestos a mediadores de daño y/o de estrés celular en forma crónica.

Nuestra hipótesis se ajusta a los eventos iniciales asociados a la patogenia de EC donde MICA podría actuar como un marcador de estrés celular en la mucosa duodenal. Sin embargo, el rol funcional de la expresión intracelular de MICA en los distintos tipos celulares (enterocitos, linfocitos T, células plasmáticas), tanto en enteropatía activa como en pacientes en dieta, aún no se conoce. Los modelos experimentales de estrés usados en nuestro estudio, en especial estrés de retículo y oxidativo, podrían al menos parcialmente, reproducir las condiciones que causan estrés *in vivo* en la mucosa. De esta manera, nuestros resultados sugieren que las condiciones de estrés *in vivo* serían las responsables de la expresión de MICA en pacientes en EC activa. La localización e intensidad de la expresión observadas en enteropatía junto con la falta de inducción del mensajero podrían describir una mucosa con una fuerte respuesta al estrés, con mecanismos regulatorios actuando a nivel transcripcional y un rol funcional para MICA en el control de poblaciones como así también un rol como indicador de la magnitud de la respuesta al estrés. En función de los resultados observados en este capítulo y el anterior creemos fundamental continuar en esta línea de trabajo y avanzar en la exploración de las vías de estrés de RE involucradas en la respuesta a proteínas mal plegadas en mucosas con enteropatía.

Materiales y Métodos.

Biopsias duodenales.

Como parte de la rutina diagnóstica de EC, y bajo consentimiento informado de familiares responsables de los pacientes, se tomaron muestras de biopsia duodenal de pacientes menores de 5 años que presentaban signos y síntomas gastrointestinales asociados a la patología celíaca. El presente estudio se realizó bajo consentimiento informado de todos los pacientes, obtenido de sus responsables legales, y con la aprobación del Comité de Investigación y Bioética del Instituto de Investigaciones Pediátricas IDIP, Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata.

La descripción de grupos de pacientes analizados corresponde a la del capítulo 1. Para el estudio de colocación de MICA con TIA-1 en mucosa duodenal se emplearon muestras de biopsia de 4 pacientes con enteropatía severa. Dos pacientes se analizaron desde tejido fijado en medio de Bowin con posterior tratamiento con paraformaldehído e inclusión del tejido en parafina; mientras que de los otros dos pacientes se congeló material endoscópico en matrices de OCT que se reservaron a -70°C hasta su uso. Secciones de dicho tejido se fijaron con acetona. Secciones conteniendo material de biopsia sometido a ambos procedimientos de fijación fueron rehidratadas y bloqueadas con suero de caballo al 5%. Sucesivamente fueron incubadas con IgG anti-h-TIA-1 policlonal de cabra seguido de anti-IgG de cabra conjugado con Cy5. Luego de esto se incubaron las muestras con $150\mu\text{g/mL}$ de mAb D7 biotinilado seguido de estreptavidina-Cy3. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio PASCAL-LSM Confocal Laser Scanning (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) y se procesaron utilizando el software LSM v3.2.

Anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal anti-MICA/B (mAb) -D7" se utilizó para estudiar la expresión de MICA. La producción del anti-MICA/B mAb, D7, fue descrita previamente (Molinero *et al.*, 2004). Como anticuerpo control negativo de igual isotipo se utilizó una IgG2b monoclonal de ratón comercial (BPC4, Ancell). El anticuerpo policlonal específico Goat IgG anti-TIA-1 (SC-1751) (Santa Cruz Biotechnology); la estreptavidina anti-IgG de cabra obtenida en burro, marcada con Cy3 (705) (Jackson ImmunoResearch); la IgG-FITC de cabra anti-IgG de ratón (sc-2010) (Santa Cruz Biotechnology). La contra-coloración se realizó utilizando el colorante de ácidos nucleicos DAPI (Molecular Probes®, Invitrogen). La solución de recuperación de tejido -Target Retrieval Solution (S1699)" y el medio de montaje para microscopía de fluorescencia -DakoCytomation fluorescent mounting medium (S3023)" (Dako).

Líneas celulares en cultivo.

La línea celular humana derivada de un adenocarcinoma de colon conocida como Caco-2, American Type Culture collection (ATCC), fue propagada en medio DMEM (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 15% FBS, (Gibco), solución buffer al 1% HEPES 1M (Gibco), penicilina/estreptomina 1% (Sigma) y 1% de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco).

La línea celular linfocítica humana Jurkat, American Type Culture collection (ATCC), fue propagada en medio RPMI suplementado con 10% FBS (Gibco), y penicilina/estreptomina (Sigma).

La línea celular monocítica humana THP-1, American Type Culture collection (ATCC), fue propagada en medio DMEM GlutamaxTM- I High Glucose (Invitrogen).

Las células fueron expuestas a estímulos de estrés o incubadas con el péptido p31-43 (100µg/mL) y/o rh-IL-15 (R&D) (50ng/mL) para estudiar la expresión de MICA.

Se utilizaron diferentes modelos de estrés *in vitro*; se indujo estrés de retículo endoplásmico utilizando Thapsigargina 1µM (Sigma), se utilizó arsenito de sodio 250 o 500µM (Sigma) para producir estrés oxidativo y el estrés térmico se indujo exponiendo a las células a 42°C. Las condiciones de estrés se confirmaron por microscopía confocal como presencia de gránulos de estrés citoplasmáticos TIA-1⁺. La expresión de MICA en condiciones de estrés se estudió por RT-PCR cuantitativa, citometría de flujo y microscopía confocal. La expresión de MICA luego de la incubación de las células con p31-43 y/o rh-IL-15 por 12 horas se estudió mediante citometría de flujo y microscopía confocal.

Immunofluorescencia en Caco-2

Las células expuestas a los tres tipos de estímulos de estrés descritos fueron lavadas con buffer PBS y fijadas en 4% paraformaldehído (PFA), seguido por dos lavados con NH₄Cl 50mM. Las células fueron permeabilizadas en 0.1% Tritón X-100 y bloqueadas con 2% BSA (Sigma) por 60 min a temperatura ambiente. Luego se incubaron secuencialmente con anti-MICA/B mAb D7, o anticuerpos control de isotipo, anti-ratón IgG-FITC, y se contra-colorearon con DAPI. La doble marcación se realizó utilizando IgG policlona de cabra anti-h-TIA-1 seguido de IgG-Cy5 anti-cabra. Luego de esto las células fueron marcadas con 150µg/ml de mAb D7 biotinilado, seguido de estreptavidina-Cy3 y contracoloreadas con DAPI (Invitrogen). Se utilizaron controles de isotipo en todos los casos analizados. Las imágenes celulares se adquirieron utilizando un microscopio PASCAL-LSM Confocal Laser Scanning (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) y se procesaron utilizando el software LSM v3.2.

Procesamiento, conservación y cultivo de biopsias duodenales

Durante la endoscopia gastrointestinal alta, se tomaron cinco muestras de biopsia de duodeno distal. Una pieza se fijó en medio de Bowin para el análisis histológico de confirmación de EC y del sobrante de este material se obtuvieron cortes fijados con paraformaldehído que luego se utilizaron en los estudios de marcación celular. Las otras piezas se utilizaron para aislamiento de RNA total, cultivo o inclusión en matrices de OCT. Previo a estas técnicas las muestras fueron transportadas al laboratorio en medio HBSS suplementado con Gentamicina 0,5g/l (Laboratorios Bagó). Para el cultivo de biopsias, las muestras se incubaron por 3 o 24 h a 37°C con 50 ng/mL de rh-IL-15 (BD Pharmingen), medio de cultivo sin estímulos, 100 µg/mL del péptido de gliadinas p31-43 (Biomedal, Spain) o rh-IL-15 y p31-43 juntos en medio RPMI suplementado con penicilina 62,4 µg/mL (Laboratorios Bagó), estreptomina 100 µg/mL (Laboratorios Bagó), gentamicina 0,5g/L y suero fetal bovino (Gibco) 10%. Luego del cultivo, las muestras fueron lavadas en HBSS/Gentamicina 0,5g/L y se extrajo el RNA total.

Extracción de RNA preparación de cDNA y procedimiento de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

El RNA se extrajo de las muestras de biopsia endoscópica o de las células tratadas utilizando Trizol® (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El RNA total se cuantificó a 260

nm, y se determinó la relación 260/280 nm para calcular la pureza de las muestras y evitar la probable contaminación con proteínas. Se realizó además electroforesis en gel de Agarosa para corroborar la alta calidad del RNA. 1 µg de RNA se mezcló con 200ng de random primers (Molecular Probes Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1µl de 10mM deoxy-(d)NTP mix, y agua; se incubó la mezcla a 65°C por 5 min, se enfrió en hielo y se centrifugó brevemente. Dicha mezcla se combinó con 5x first-strand buffer, DTT, RNase inhibitor, y M-MLV-RT (Molecular Probes Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), se incubó a 37°C por 50 min y a 70°C por 15 min. La reacción se realizó en una cicladora Eppendorf MasterCycler Gradient. El cDNA resultante se utilizó en experimentos de qPCR junto con SYBR Green Supermix (BioRad), de acuerdo a las especificaciones del fabricante; con los siguientes primers:

MICA forward (5'-GGATGACCCTGGCTCATATCA-3')
reverse (5'-AGATTAGGGTCTGTGAGATCCATG-3') (Martin-Pagola *et al.*, 2003),
β-actina forward (5'-ATGGGTCAGAAGGATTCCTATGTG-3')
reverse (5'-CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGTC-3') (Bongers *et al.*, 2003).

Para la detección a tiempo real se utilizó una cicladora IQ5 Optical Lid BioRad MyIQ Cycler Real Time PCR detection system. Se determinó expresión relativa y se expresó como unidades arbitrarias.

Citometría de flujo.

Para el análisis por citometría de flujo de las células aisladas de biopsias intestinales o de las células de líneas celulares en cultivo, 0.5×10^6 células/tubo se incubaron con suero humano inactivado para bloquear receptores Fc. Se realizaron marcaciones de superficie e intracitoplasmáticas permeabilizando a las células utilizando el kit comercial Fixation & Permeabilization Kit (eBioscience) según las especificaciones del fabricante. Las células fueron incubadas con 150µg/mL anti-MICA/B D7 mAb seguido de IgG-FITC anti-ratón; y en caso de doble marcación para gránulos de estrés se incubaron con IgG policlonal de cabra anti-h-TIA-1 seguido de IgG-Cy5 anti-cabra. Luego de esto las células fueron marcadas con 150µg/ml de mAb D7 biotinilado, seguido de estreptavidina-Cy3 y contracoloreadas con DAPI (Invitrogen). Se utilizaron controles de isotipo en todos los casos analizados. El análisis de las poblaciones se realizó en un equipo BD FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences), utilizando softwares CELLQuest™ (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Análisis estadístico

Para los gráficos y el análisis estadístico de los datos utilizamos el software GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA). En el análisis de los datos utilizamos el test de análisis no paramétrico de Kruskal Wallis seguido del posttest de comparación múltiple de Dunns o el U test no paramétrico de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Capítulo 3. Mediadores Inflamatorios de la Lesión de la Mucosa Intestinal en EC.

Parte de los resultados del presente capítulo forman parte del artículo

“Higher constitutive IL15R α expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients”.

D. Bernardo, J. A. Garrote, Y. Allegretti, A. León, E. Gómez, J. F. Bermejo-Martin, C. Calvo, S. Riestra, L. Fernández-Salazar, A. Blanco-Quirós, F. Chirido and E. Arranz. Clinical and Experimental Immunology. Julio 3, 2008. doi: 10.1111 / j.1365 -2249. 2008.03743.x

“Increased intraepithelial V α 24 invariant NKT cells in the celiac duodenum”.

Enrique Montalvillo, David Bernardo, Beatriz Martínez-Abad, Yessica Allegretti, Luis Fernández-Salazar, Carmen Calvo, Fernando Chirido, José A. Garrote, Eduardo Arranz. Nutrients. Aceptado para su publicación el 21 de Octubre de 2015 bajo el número: 94966.

Introducción.

Como hemos comentado, la lesión en mucosa duodenal en EC activa se caracteriza por una respuesta exacerbada de perfil Th1 específica de péptidos derivados de gluten. Aunque esto ha sido bien caracterizado, las etapas iniciales y de sostenimiento durante la fase crónica no están completamente dilucidadas. Es posible que diferencias en los genes menores de susceptibilidad y condiciones ambientales como infecciones, influyan sustancialmente en el curso de la patología. En este sentido, la naturaleza de la respuesta inmune que se desarrolla frente a una dada situación de estrés, infección, o cualquier tipo de agresión, que sea capaz de alterar el estado de homeostasis, está estrechamente regulada por las células dendríticas (CD). Estas involucran múltiples subpoblaciones de células equipadas con conjuntos únicos de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) y que poseen funciones especializadas de acuerdo al programa de diferenciación seguido (Haniffa *et al.*, 2012; Banchereau and Steinman, 1998).

El estudio de las CD en muestras humanas es habitualmente más difícil que en ratón, en parte debido a que es común que exista una limitada accesibilidad a muestras lo suficientemente grandes como para obtener un número adecuado de células, dado que estas poblaciones son poco numerosas y a su vez, que los marcadores disponibles no permiten, en ocasiones, diferenciar claramente las subpoblaciones. Se han establecido diferentes clasificaciones de las subpoblaciones de CD presentes en los diferentes tejidos tanto linfoides como no linfoides. Uno de los marcadores utilizados, es la molécula CD11c que originalmente permitió la comparación con el sistema de CD en ratón. Mencionamos este marcador, como ejemplo de la complejidad del sistema ya que no se observa un estricto paralelismo entre ratón y humano. Esta diferencia en la asignación de marcadores entre ratón y humano, ha dificultado la interpretación de los resultados y la definición de las subpoblaciones de CD en humanos.

Las técnicas más empleadas para caracterizar poblaciones celulares en los tejidos han sido la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. La falta de anticuerpos que puedan utilizarse en tejidos limita el uso de la microscopía de fluorescencia. Por otro lado, para estudiar el complejo conjunto de subpoblaciones de CD se requiere el empleo simultáneo de diferentes anticuerpos específicos de diferentes marcadores, y equipos de citometría de flujo capaces de realizar un análisis multiparamétrico de 6 o más colores.

Es cierto que en humanos, la descripción de las subpoblaciones de CD es más compleja y no todas las CD expresan CD11c. Sin embargo, para el análisis por microscopía de fluorescencia no se cuenta con paneles de anticuerpos adecuados y el uso de anticuerpos anti-CD11c ha permitido obtener información valiosa.

El estudio de las subpoblaciones de CD en intestino, permite entender los diferentes roles funcionales de estas células, ya sea en inducir una respuesta regulatoria (situación homeostática) o en la diferenciación de perfiles efectoros (Th1, Th2 o Th17). En relación a EC, ha interesado el estudio de las CD que puedan promover un perfil Th1 y también, dada la relevancia adquirida en los últimos años, en la generación de células Th17. Como ya hemos mencionado, Th1 es el perfil dominante de la respuesta en EC, pero diferentes evidencias sugieren que la respuesta Th17 puede ser determinante en las etapas iniciales o en el sostenimiento de la cronicidad. Entre otras señales, para la diferenciación de las células Th17, se requiere la presencia de IL-23, citoquina que tiene un papel crucial en la patogénesis de desórdenes autoinmunes e inflamatorios crónicos. Los linfocitos

Th17 producen citoquinas inflamatorias IL-17A, IL-17F, IL-6, factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF), $TNF\alpha$, y quimoquinas como CCL20 (Langrish *et al.*, 2005; Murphy *et al.* 2003; Harrington *et al.* 2005; Park *et al.*, 2005). Además de las células Th17, muchas células de la inmunidad innata responden a IL-23 y también son importantes tanto para la resistencia a infecciones como en el desarrollo de patologías autoinmunes. Estas células se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR γ t (Ivanov *et al.*, 2006) e incluyen subpoblaciones de linfocitos T γ/δ , células NKT, "innate lymphoid cells" o células linfoides innatas (CLI) (Cua DJ & Tato CM, 2010; Zuniga *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Marks *et al.*, 2009).

Las células Th17 tienen un rol crítico en los mecanismos de defensa en la mucosa, contribuyen al mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial y a la reparación tisular, aunque también, como hemos mencionado, en una respuesta exacerbada, pueden generar una respuesta inflamatoria crónica y autoinmunidad (McGeachy *et al.*, 2007; Hirota *et al.*, 2013, Esplugues *et al.*, 2011; Chackerian *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Lieberman *et al.*, 2004). Sin embargo, se conoce que IL-23 sola no es capaz de conducir la diferenciación de las células Th17 desde linfocitos T CD4⁺ naive (Langrish *et al.*, 2005; Bettelli *et al.*, 2006), lo que indica que factores adicionales serían necesarios para su diferenciación. IL-6 tiene un papel esencial en dicho proceso de diferenciación mediante la activación de STAT3, que conduce directamente a la transcripción de genes específicos asociados a linaje Th17, incluyendo Rorc, IL-17 e IL-23R (Durant *et al.*, 2010). STAT3 también suprime la expresión de FoxP3 y, por lo tanto, inhibe la generación de células T regulatorias (Treg) (Bettelli *et al.*, 2006).

Mientras que IL-6, IL-23 y TGF β regularían la diferenciación inicial de las células Th17, IL-21 sería un factor de crecimiento autócrino importante asociado al perfil Th17 (Korn *et al.*, 2007; Nurieva *et al.*, 2007; Spolski R & Leonard WJ, 2008).

Aunque las células Th17 no evolucionaron para causar autoinmunidad, sino para proporcionar la defensa eficaz del huésped contra los patógenos; están programadas para proporcionar respuestas protectoras muy eficientes, como el rápido reclutamiento y activación de granulocitos y macrófagos para la producción de especies reactivas del oxígeno y el daño al tejido (Stark *et al.* 2005; Chung *et al.*, 2009; Sherlock *et al.*, 2012). IL-17 induce principalmente señalización en células de origen no hematopoyético, como células epiteliales y mesenquimales. Los genes que son inducidos por IL-17 explican en gran medida sus características pro-inflamatorias, por ejemplo, IL-17 induce la expresión de quimoquinas tales como CXCL1, CXCL2 y CXCL5, que promueven quimiotaxis de neutrófilos (Shen *et al.*, 2005). IL-17 también induce la expresión de CCL20, que promueve la afluencia a la mucosa de células que expresan el receptor de quimoquinas CCR6. En particular, CCR6 es un receptor característico de células Th17 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007). Otras citoquinas inducidas por IL-17, tales como IL-6 y G-CSF, expanden poblaciones de células mieloides y especialmente neutrófilos. Además, IL-17 es un potente inductor de péptidos antimicrobianos, en particular β -defensinas, que pueden prevenir la infección en las superficies mucosas y en la piel, y que también pueden ejercer actividad quimiotáctica (Yang *et al.*, 1999).

Se ha visto que IL-17A actúa además directamente sobre células T efectoras inhibiendo la expresión de factores que coordinan la diferenciación Th1 (O'Connor *et al.*, 2009). De hecho, en un modelo de transferencia adoptiva de colitis se ha probado que la falta de IL-17A acelera el desarrollo de una inflamación severa inducida por células Th1 (O'Connor *et al.*, 2009). Por lo tanto, IL-17A tiene

un efecto protector y en especial homeostático en la mucosa pero que, bajo condiciones de respuesta exacerbada, podría contribuir a modular la respuesta inflamatoria en EC. Si bien IL-21 se ha encontrado sobreexpresada en mucosa duodenal en EC activa (Fina *et al.*, 2008); el aporte de la vía IL-23/Th17 a EC está aún poco evaluado (Monteleone *et al.*, 2010).

IL-15 es una citoquina central de la respuesta innata, con funciones probadas en el desarrollo de los mecanismos de patogenia en EC (**Figura 1**). Como ya se comentó, en duodeno de pacientes celíacos, su síntesis se induciría en presencia de ciertos péptidos tóxicos como el p31-43 y p31-49 (Hüe *et al.*, 2004; Maiuri *et al.*, 2003). Sin embargo, se sabe que los niveles de RNAm de IL-15 no cambian cuando se compara tejido duodenal de pacientes con EC activa y controles. La producción de IL-15 está estrictamente regulada en varios puntos de control, por esto es que el estudio aislado de los niveles de RNAm no aporta información sobre su función biológica. Esta citoquina es expresada generalmente asociada a la cadena alpha de su receptor (IL-15R α), quien trans-presenta IL-15 a células adyacentes mediante el modulo de señalización IL15R β/γ c. Es así que la regulación de IL-15 es fundamentalmente post-transcripcional, sin embargo los mecanismos de regulación aun no se conocen con exactitud (Meresse *et al.*, 2012; Fehniger and Caligiuri, 2001).

IL-15 puede ser sintetizada por varios tipos celulares. Se expresa en general en células de la *lamina propria* y en enterocitos (Di Sabatino *et al.*, 2006; Mention *et al.*, 2003). Estudios en ratón han mostrado que la sobreexpresión de IL-15 en enterocitos tiene consecuencias funcionales diferentes de su sobreexpresión en *lamina propria*. En este sentido, se sabe que el enterocito produce IL-15 que genera señales de sobrevivencia para los LIEs (Schluns *et al.*, 2004) permitiendo así la presencia de gran cantidad de estas células en el epitelio. Otro efecto relevante de IL-15, ya comentado, es la inducción de proliferación de enterocitos de criptas por péptidos de gliadinas y en especial el p31-43, mediante la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); que explicaría la hiperproliferación de criptas observada en EC activa (Barone *et al.*, 2011).

Además, en epitelio intestinal, IL-15 induce la expresión de ligandos de estrés celular en los enterocitos como MICA/B tal como se desarrolló en los capítulos 1 y 2, y potencia la citotoxicidad de los LIEs promoviendo su activación tipo NK. Entre sus funciones sobre los LIEs induce la secreción de mediadores de inflamación no específicos, tales como ácido araquidónico (Tang *et al.*, 2009) y leucotrienos (**Figura 1**), además produce aumento de la permeabilidad epitelial en un mecanismo dependiente de zonulina. En *lamina propria* induce la formación de la enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) (De Stefano *et al.*, 2006) mediante un mecanismo dependiente de NF- κ B (Clemente *et al.*, 2003). IL-15 contribuye al bloqueo de los efectos anti-inflamatorios de TGF β , por inhibición de su vía de señalización dependiente de Smad3 (Benahmed *et al.*, 2007). A estos mecanismos se agrega además la re-estructuración de la matriz extracelular debida a la liberación del factor de crecimiento de keratinocitos (KGF), probablemente también implicado en la hiperplasia de criptas, junto con la producción de metaloproteasas (MMPs), que sumado al descenso de sus inhibidores tisulares (TIMPs) (Mohamed *et al.*, 2006; Bister *et al.*, 2005; Zebrowska *et al.*, 2005) podrían ser responsables de la degradación de la matriz extracelular y la pérdida de las vellosidades intestinales. Las metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores TIMPs juegan un papel importante en un número de procesos fisiológicos y patológicos. Las MMPs son una familia de endopeptidasas y su función

principal es la degradación de todos los componentes de la matriz extracelular. Se requiere de un equilibrio entre las MMPs y los TIMPs en procesos de morfogénesis y reparación de los tejidos.

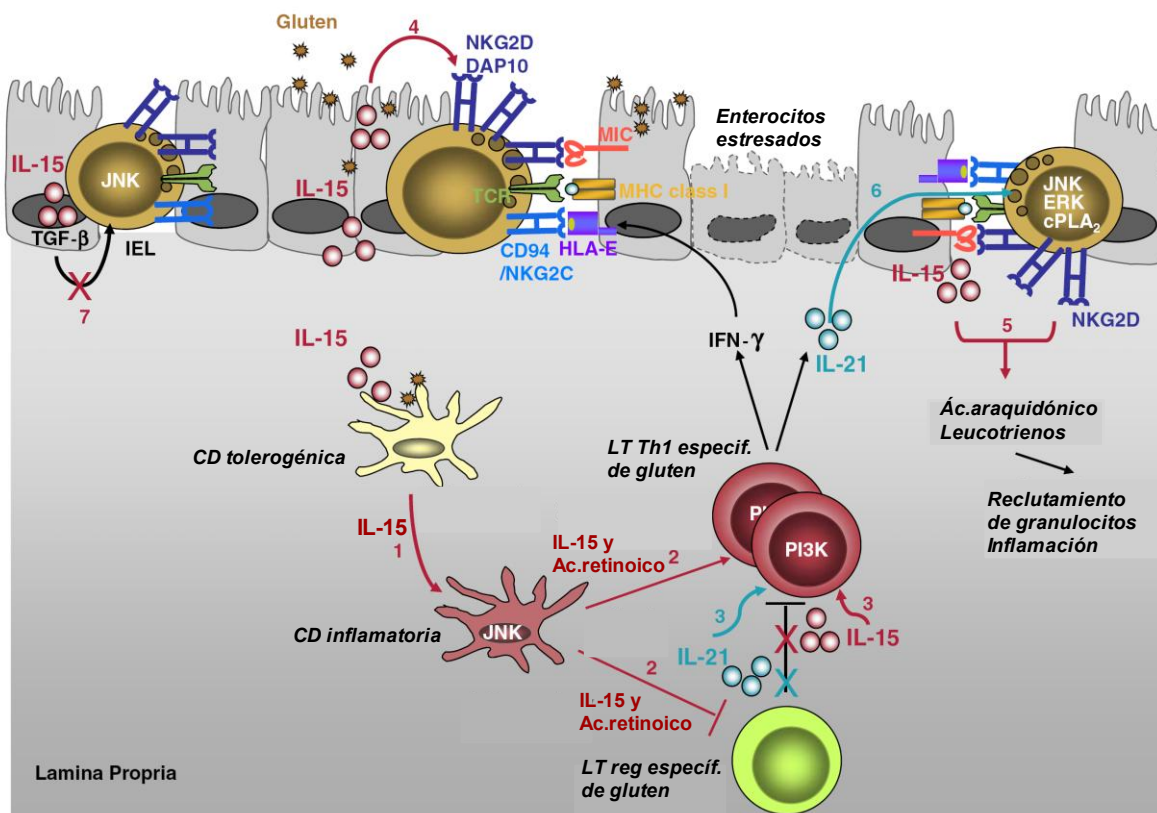


Figura 1. Mediadores moleculares y celulares en la patogénesis de EC. IL-15 e IL-21 actúan sobre varios tipos celulares mediante múltiples vías inmunológicas. **1** En lamina propia, las CD adquieren propiedades inflamatorias en presencia de IL-15. **2** por acción sinérgica de IL-15 y ácido retinoico, se inhibe la diferenciación de linfocitos T reguladores y se inducen linfocitos Th1. **3** IL-15 e IL-21 permiten que los linfocitos T CD4⁺ efectores sean resistentes a las funciones supresoras de linfocitos Treg, a través de un mecanismo dependiente de PI3K. **4** IL-15 induce la expresión de NKG2D por aumento de la transcripción de los genes de NKG2D y DAP10 en LIEs y co-estimula las vías de señalización asociadas a este receptor. **5** La activación de la vía de NKG2D en conjunto con IL-15 lleva a la secreción de ácido araquidónico y posiblemente leucotrienos por los LIEs, lo que a su vez puede promover el reclutamiento y activación de granulocitos y de mecanismos de inflamación. **6** IL-21 promueve la expresión de perforinas y granzima B. **7** IL-15 aumenta la resistencia de los LIEs a los efectos regulatorios de TGF-β.

Debido a la posición central que tiene IL-15 en el desarrollo de los cambios tempranos que se suceden en la mucosa con EC, el estudio del eje IL-15/IL-15R α en el contexto de la mucosa intestinal con y sin enteropatía es importante para entender cómo se desarrolla la respuesta innata a gliadinas y comprender por qué se establece EC solo en algunos individuos.

La regulación de la respuesta inmune frente a antígenos de la dieta y de la flora comensal está determinada por la presencia de CD que inducen linfocitos T reguladores. Estas CD se diferencian en lamina propia de intestino a partir de precursores que se renuevan permanentemente (Mowat A., 2003; Viney *et al.*, 1998; Mills KGH, 2004). Los linfocitos Treg expresan el factor de transcripción Foxp3 y tienen dos orígenes. Por un lado, se encuentran las células reguladoras centrales o tímicas, que emigran del timo ya diferenciadas (cuya función es controlar la respuesta autoreactiva), y por otro lado están las células Tregs inducidas. Estas últimas son determinantes para controlar la respuesta en intestino frente a componentes inocuos de la microbiota o de los antígenos alimentarios (Hauet-Broere *et al.*, 2003; Worbs *et al.*, 2006).

Existe otra población celular, conocida como células iNKT, presente en intestino fundamental en el mantenimiento de la homeostasis. Las células NKT se definieron originalmente por la co-expresión del TCR α/β y receptores de células NK, especialmente NK1.1 en ciertas cepas de ratón, y CD161 en el hombre (Kronenberg, 2005). En la actualidad, la clasificación más aceptada está basada en la composición de su TcR y en la molécula presentadora de antígeno que reconocen, distinguiéndose entre cuatro poblaciones (Wingender and Kronenberg, 2008) (**Tabla 1**).

	CÉLULAS NKT CANÓNICAS O CLÁSICAS				CÉLULAS NKT VARIABLES O NO CLÁSICAS	
	Células NKT invariantes o iNKT		Células NKT asociadas a mucosa o mNKT		Células NKT variables o vNKT	Células NKT-like o xNKT
	Humano	Ratón	Humano	Ratón	Humano/Ratón	Humano/Ratón
TCR	V α 24-J α 18	V α 14-J α 18	V α 7.2-J α 33	V α 19-J α 33	Variable	Variable
Molécula presentadora de antígeno	CD1d		MR1		CD1d	MHC I/II
Principales ligandos	α GalCer, GSL, iGb3		α ManCer		No determinado	Diversos péptidos
Principales receptores NK	CD56, CD161	NK1.1	CD161	NK1.1	CD161/NK1.1	DX5/NK1.1
Correceptores	CD4, CD8 $\alpha\alpha$, DN	CD4, DN	CD4, CD8 $\alpha\alpha$, DN	CD4, DN	CD4, DN	CD4, CD8 $\alpha\alpha$, DN
Fenotipo en sangre periférica	Efector/memoria		Efector/memoria		Efector/memoria	Efector/memoria /Naive
Requerimientos para su desarrollo	IL-15		Células B con MR1, flora intestinal		No determinado	No determinado
Localizaciones principales	Hígado, timo, médula ósea, bazo, mucosa intestinal y pulmonar		Hígado, mucosa intestinal y pulmonar		Hígado y bazo	Hígado, bazo, médula ósea

Tabla 1. Características de las diferentes poblaciones de células NKT.

NKT: célula T *natural killer*; MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad; α GalCer: α -GalactosilCeramide; GSL: glicoesfingolípidos; iGb3: isoglobotrihexosilceramida; α ManCer: α -Manosilceramide; DN: doble negativa.

La fracción más numerosa y mejor estudiada de las células NKT son las denominadas NKT *invariantes* (iNKT). Las células iNKT expresan un TcR semi-invariante compuesto por las cadenas V α 14 - J α 18 y V β 8.2, -7, o -2 en ratones, o las cadenas homólogas V α 24-J α 18 y V β 11 en el hombre (Godfrey *et al.*, 2004). Por esto, los anticuerpos anti-V α 24 constituyen el método estándar que se utiliza para detectarlas (Bernardo *et al.*, 2008; Van der Vliet *et al.*, 2001). Estas células reconocen estructuras glicolípídicas, presentadas por la molécula CD1d, homóloga de MHC de clase I (Godfrey *et al.*, 2004).

A medida que se diferencian en el timo, las células iNKT cambian la expresión de los marcadores hasta expresar un conjunto (CD69⁺, CD44^{alto}, CD11a^{alto}, CD62^{bajo}, CD122⁺) asociado típicamente a linfocitos T de memoria o activados (Wingender and Kronenberg, 2008). Estas células pueden subdividirse en CD4⁺ y CD4⁻ (aunque la mayoría dentro de este grupo son CD4⁻CD8⁻). Las células iNKT CD4⁻CD8⁻ producen predominantemente citoquinas Th1 mientras que las células iNKT CD4⁺ pueden producir tanto respuestas de tipo Th1 como Th2 (La Cava *et al.*, 2006). Las células iNKT pueden estar implicadas en las primeras fases de una gran variedad de respuestas inmunes, como en el desarrollo de patologías de tipo autoinmune, o respuestas frente a agentes patógenos y procesos tumorales (Kronenberg, 2005; Tupin *et al.*, 2007). Además, la activación inadecuada de las células iNKT puede contribuir a la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales (Van

Kaer *et al.*, 2011). Las células iNKT también pueden ser activadas de una manera directa a través de citoquinas proinflamatorias, tales como IFN γ , IL-12 e IL-18, las cuales son producidas por macrófagos y CD de manera temprana en la respuesta ante infecciones de origen bacteriano o viral (Lawson, 2012).

Las células del sistema inmune presentes en mucosa intestinal y en los compartimentos asociados determinan, mediante activación de factores de transcripción específicos, secreción de citoquinas, expresión de receptores y ligandos y señalización por quimoquinas. Además se producen cambios en la mucosa, que llevan al desarrollo de los mecanismos tempranos asociados al daño en EC y al establecimiento de la fase crónica que perpetúan mecanismos que llevan al remodelamiento de la arquitectura de la mucosa y la consecuente pérdida funcional observada en estos pacientes.

Dada la complejidad de los mecanismos activos de daño en la enteropatía, en este capítulo, nos interesó evaluar el rol de las células dendríticas y su participación en la producción de mediadores inflamatorios, estudiar en particular el eje IL-15/IL-15R α y su asociación con la producción de IFN γ , y con la expresión de FoxP3 y V α 24, en relación a las células iNKT.

Objetivos

- Estudiar la distribución tisular de células dendríticas en mucosa de intestino delgado y su relación con mediadores proinflamatorios.
- Evaluar la expresión del eje IL-15/IL-15R α en mucosa intestinal con y sin enteropatía y su posible rol biológico en el desarrollo de la patología.
- Evaluar si el número de células iNKT en el duodeno de pacientes celíacos se encuentra conservado, comparándolo con controles no celíacos, y estudiar si las diferencias en el número de células iNKT pueden tener algún efecto en la patogénesis de EC.
- Estudiar la expresión de FoxP3 en mucosa intestinal con y sin enteropatía.

Resultados.

Parte de los resultados de este capítulo se desarrollaron en colaboración con el grupo de trabajo dirigido por el Dr. E. Arranz (Universidad de Valladolid. España).

Análisis de la Células Dendríticas de la lamina propia en mucosa duodenal humana.

Las CD de la *lamina propria* del intestino delgado son críticas en la generación de los procesos regulatorios y en la instrumentación de la respuesta inflamatoria. Estas células juegan un rol fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los mecanismos que llevan al daño en mucosa duodenal en EC activa. Si bien sus funciones han sido analizadas en detalle por muchos autores, la mayoría de los datos de los que se dispone provienen de experimentos hechos en ratón. Debido a la dificultad para acceder a muestras de tejido en humanos y el bajo número en el que se encuentran en mucosa duodenal, la información sobre las CD en intestino delgado humano es incompleta. Por esta razón, nos interesó estudiar las CD en mucosa duodenal humana tanto en pacientes con EC como en controles sanos. Si bien existen diferentes poblaciones de CD con diversos marcadores propuestos para cada población, en nuestro trabajo hemos estudiado la localización de las CD CD11c⁺ ya que este es un marcador que abarca varias subpoblaciones y se dispone de anticuerpos que permiten su análisis por microscopía de fluorescencia en tejidos fijados con formaldehído.

Localización de las células dendríticas en lamina propia duodenal.

Con el fin de evaluar la distribución de las CD en la mucosa duodenal, se analizó su localización mediante microscopía confocal de fluorescencia usando el marcador CD11c. En la **Figura 2**, se observa un bajo número de células CD11c⁺ tanto en controles como en celíacos. En forma llamativa, las células dendríticas se ubican muy próximas al epitelio, y en ocasiones se observan grupos de células en tejido con enteropatía severa.

En base a las imágenes de microscopía confocal evaluamos el número de células CD11c⁺ en la mucosa duodenal. Encontramos que no hay diferencias significativas cuando se compara tejido control y con enteropatía severa (**Figura 3**).

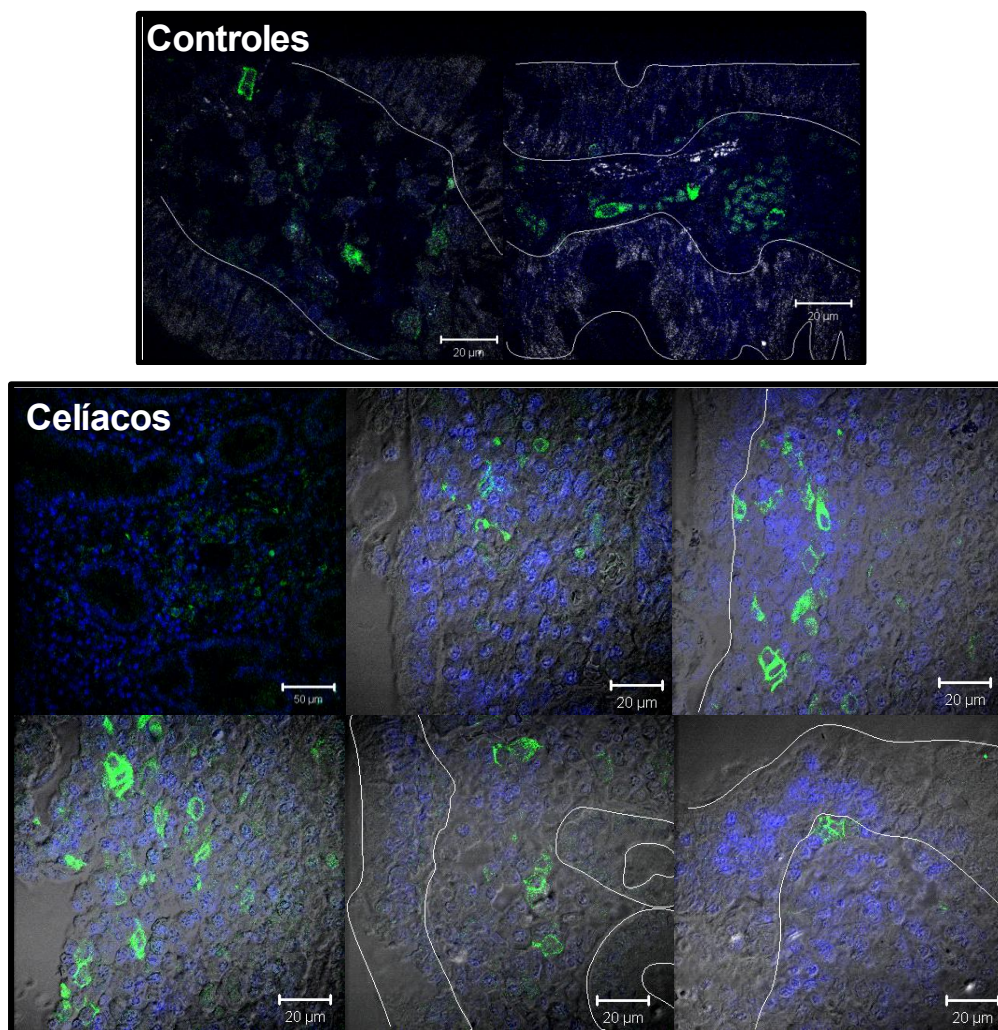


Figura 2. Localización de células dendríticas en mucosa duodenal. Microscopía confocal de fluorescencia en biopsias de intestino delgado mostrando células CD11c⁺ (verde). Núcleos DAPI⁺(Azul). En blanco y gris se observa el relieve del tejido en el cual se ha delimitado el epitelio. Magnificación 63x, excepto la primer foto con enteropatía, 40x.

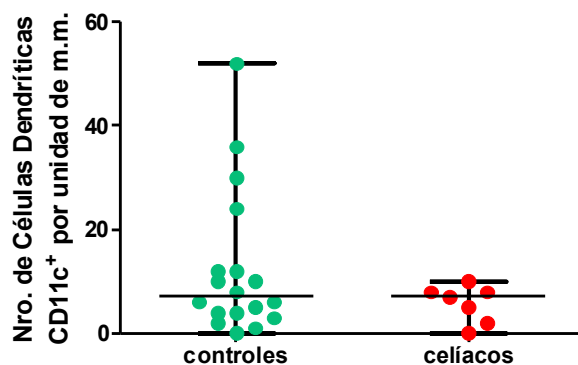


Figura 3. Células CD11c⁺ en duodeno. Recuento de células CD11c⁺ en mucosa duodenal de 8 pacientes con enteropatía severa y 18 controles. El recuento se realiza por unidad de *muscularis mucosae*. Cada punto corresponde al promedio de células observado por unidad de m.m. en un paciente (el área correspondiente a 6 criptas) evaluada por duplicado, U-test de Mann-Whitney. ns.

Producción de IL-23 por Células Dendríticas de la mucosa intestinal.

Como es bien sabido, $\text{IFN}\gamma$ es la citoquina más abundante en la enteropatía. Sin embargo, no se ha establecido claramente el mecanismo que sostiene su producción en la fase crónica. Estudios en ratón han mostrado que IL-23 es producida fundamentalmente por CD capaces de intervenir en el mantenimiento de una respuesta inflamatoria. Por esta razón, nos interesó evaluar la presencia de células productoras de IL-23 por microscopía confocal en muestras de duodeno de pacientes celíacos al diagnóstico y de controles. Las células IL-23p19⁺ se encontraron tanto en biopsias de pacientes celíacos como de controles; sin embargo su distribución en el tejido resultó claramente diferente para ambas condiciones. En tejido sano, las células IL-23p19⁺ se encontraron en las criptas, mientras que en mucosa con EC activa se las evidenció en regiones pericripticas y ocasionalmente en vellosidades. Si bien no hemos podido realizar el recuento de células positivas, las imágenes obtenidas sugieren que el número de células IL-23⁺ es mayor en enteropatía que en tejido control. Aunque no pudimos realizar ensayos de colocalización en microscopía de fluorescencia para identificar estas células, la morfología de las células IL-23p19⁺ en enteropatía sugiere que son CD, mientras que en tejido sano la producción de IL-23p19 se asocia a células de linaje epitelial (**Figura 4**).

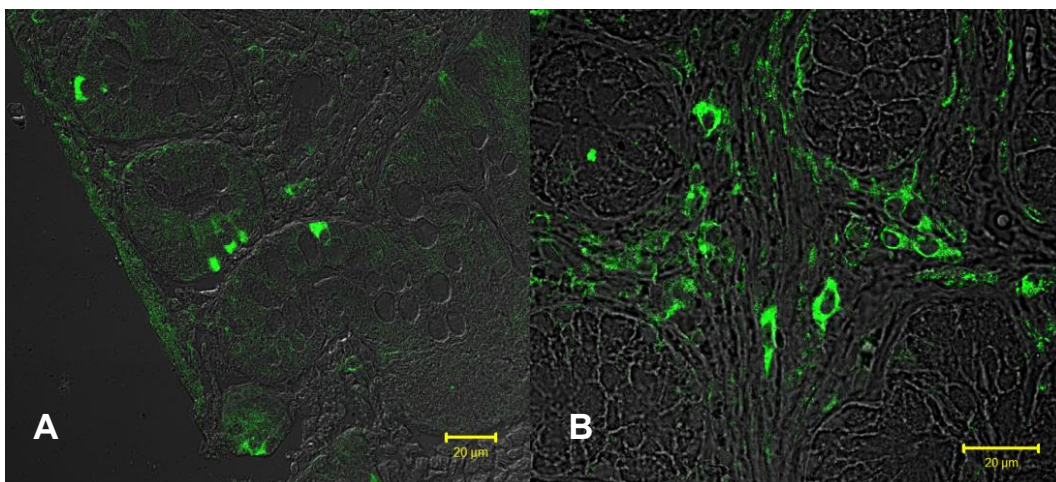


Figura 4. Células IL-23p19⁺ en intestino delgado. Imágenes representativas de la producción de IL-23p19 (verde), en gris se observa la estructura del tejido. **A.**- individuo control. **B.**- Enfermo celíaco. Magnificación 63x.

Análisis del patrón de citoquinas y sus receptores en la mucosa intestinal humana.

Habiendo hallado células productoras de IL-23 en la mucosa duodenal, nos interesó ampliar nuestra evidencia sobre la distribución de células asociadas al perfil Th17 en mucosa con y sin enteropatía. Con este fin, evaluamos en muestras duodenales de pacientes celíacos al diagnóstico y controles, la expresión de IL-17 a nivel de RNAm y la presencia de células IL-17⁺ en mucosa duodenal. Observamos un aumento de expresión de RNAm de IL-17 en EC activa comparado con muestras de población control. Mediante microscopía confocal, observamos células IL-17⁺ en *lamina propria* y en el compartimiento intraepitelial. Estas células son relativamente frecuentes en mucosa intestinal de tejido sano, localizándose en la *lamina propria* pericriptica. En cambio, en enteropatía severa las células IL-17⁺ se observaron más frecuentemente en la zona de *lamina propria* subluminal. El recuento de células IL-17⁺ en mucosa duodenal, no mostró diferencias significativas cuando se evaluó mucosa duodenal sin lesión y muestras con enteropatía (**Figura 5**).

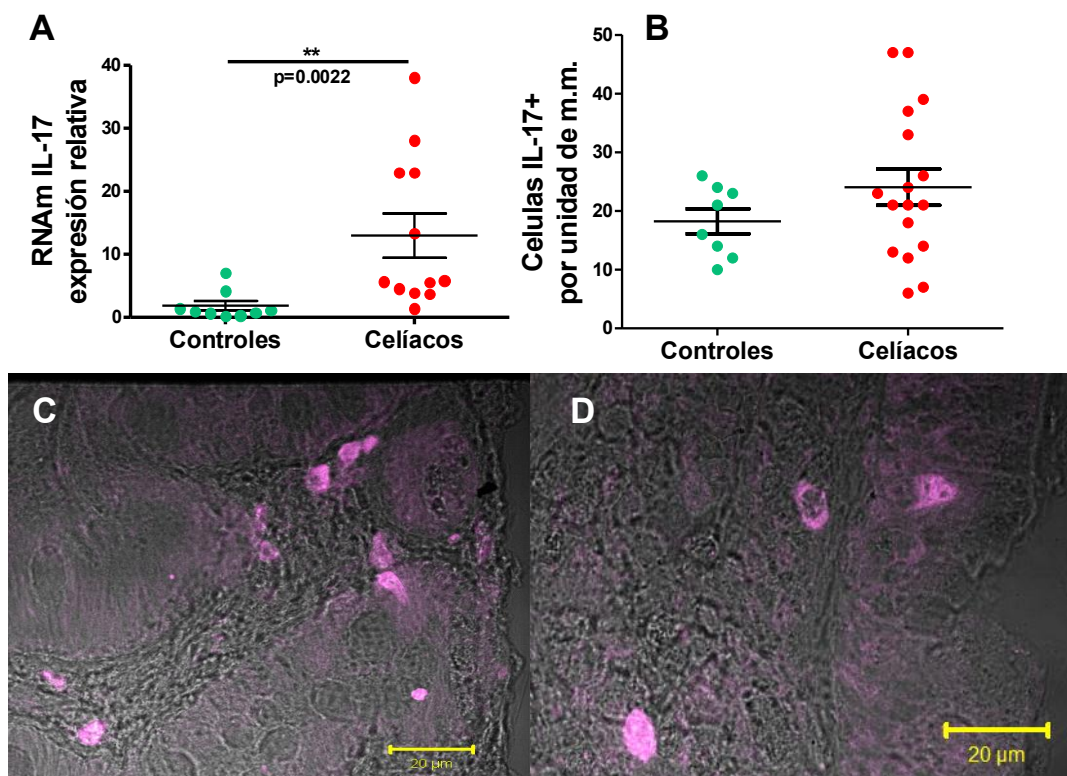


Figura 5. Expresión de RNAm de IL-17 y presencia de células productoras de IL-17 en mucosa intestinal. **A.-** Expresión intestinal de RNAm de IL17 en unidades arbitrarias (U) en biopsias de pacientes controles no celíacos (n=9) y en pacientes celíacos (n=12). U-test de Mann-Whitney, P=0.0022. **B.-** número de células IL-17⁺ en mucosa intestinal por unidad de muscularis mucosae en pacientes control (n=5) y en pacientes con enteropatía severa (n=8) (U-test de Mann-Whitney, P=n.s.). Análisis por microscopía confocal de fluorescencia en mucosa control (**C**) y con enteropatía severa (**D**). Se observan las células IL-17⁺ (en violeta), y en tonos de gris el relieve del tejido. Magnificación 63x.

Diferentes autores han mostrado la importancia de IL-21 en el desarrollo de la lesión en EC, si bien se conoce que en EC existe un aumento en la expresión de IL-21 en celíacos, existen resultados contradictorios en la relación entre IL-17 e IL-21 en EC. Por esta razón, hemos analizado la expresión a nivel de RNAm de IL-21 en la población local de pacientes. Los resultados indican que la expresión de IL-21 a nivel de RNAm es significativamente mayor en muestras duodenales en EC activa que en población control (**Figura 6**).

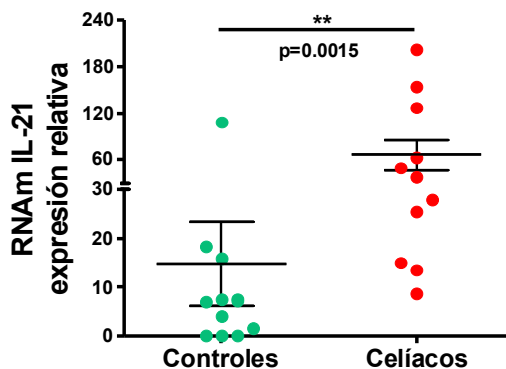


Figura 6. Expresión aumentada de IL-21 en duodeno en EC activa. Niveles de RNAm en unidades arbitrarias (U) en biopsias duodenales de pacientes controles no celíacos (n=12) y en pacientes celíacos (n=11). U-test de Mann-Whitney, P=0.0015.

Rol del eje IL15/IL15R α en la patogenia de Enfermedad celíaca.

Dada la importancia que ha cobrado la señal vía IL-15 en el desencadenamiento de la respuesta innata en intestino delgado, decidimos estudiar la expresión de su receptor en la mucosa intestinal. Se analizó la expresión del IL-15R α , por PCR cuantitativa en muestras duodenales de controles, celíacos al diagnóstico y sometidos a dieta libre de gluten (DLG); y por microscopía confocal sobre cortes incluidos en parafina, de pacientes celíacos al diagnóstico y controles sanos.

Expresión aumentada de RNAm de IL15R α en pacientes celíacos.

Se estudió la expresión de IL15R α en piezas de biopsia duodenal de pacientes celíacos al diagnóstico, pacientes en dieta libre de gluten así como en controles no celíacos. En la **Figura 7**, se observa que la expresión del RNAm de IL15R α es mayor en pacientes celíacos, con independencia de la ingesta de gluten, (celíacos en DLG y celíacos al diagnóstico); comparado con controles no celíacos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes celíacos en dieta libre y en dieta conteniendo gluten (celíacos al diagnóstico), lo que descartaría valores altos debidos a inflamación por ingesta de gliadinas, y apuntaría a una condición constitutiva o primaria en enfermos celíacos. De manera similar, no se encontró correlación entre el grado de lesión histológica y la expresión de IL15R α en pacientes en dieta conteniendo gluten o pacientes en dieta libre. Finalmente, es notorio que la expresión del RNAm de IL15R α siga una distribución bi-modal como se observa en el grupo no celíaco, de hecho el grupo de alta expresión se encuentra en el rango de valores que muestran los pacientes celíacos.

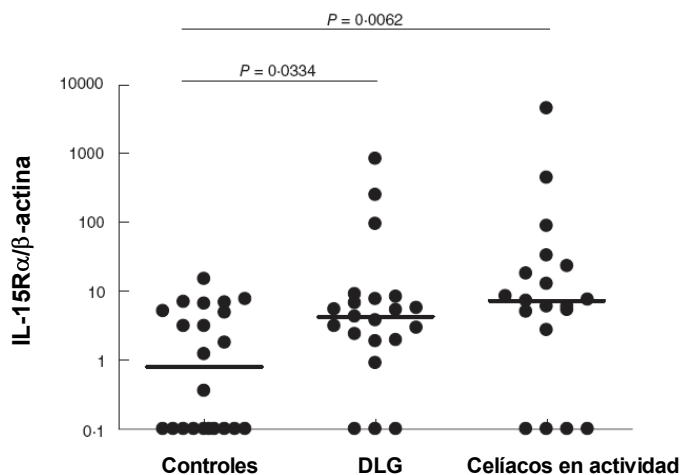


Figura 7. Expresión de RNAm de IL15R α en duodeno. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de RNAm de IL15R α (en unidades arbitrarias, U), en biopsias de pacientes controles no celíacos (n=22), y en pacientes celíacos, tanto en dieta libre (DLG, n=20), como en dieta conteniendo gluten (Celíacos al diagnóstico, n=19). Solo las isoformas no secretadas que contienen el exón 3 son detectadas. Se muestran las diferencias significativas observadas ($P < 0,05$ Test de análisis de varianza de Kruskal-Wallis). Las barras horizontales indican el valor de la mediana.

Análisis de expresión de IL15R α en mucosa duodenal.

Por microscopía confocal, se evidenció mayor expresión de IL15R α en celíacos comparado con controles no celíacos. Se observó un abundante número de células IL-15R α^+ en la mucosa celíaca en una imagen claramente diferente a la encontrada en mucosa de pacientes control (**Figura 8**). De hecho se identificó un gran número de células IL15R α^+ en el epitelio y la *lamina propria*, en cortes histológicos de biopsias de pacientes celíacos al diagnóstico (**Figura 8B**). Por el contrario, en tejido de controles no celíacos se observaron muy pocas células positivas en *lamina propria* (**Figura 8A**). Estos resultados confirman la existencia de diferencias en la expresión de IL15R α biológicamente activo entre individuos celíacos y controles. Basándonos en la morfología y localización de las células IL15R α^+ , estas imágenes sugieren que estas células pertenecerían a diferentes linajes.

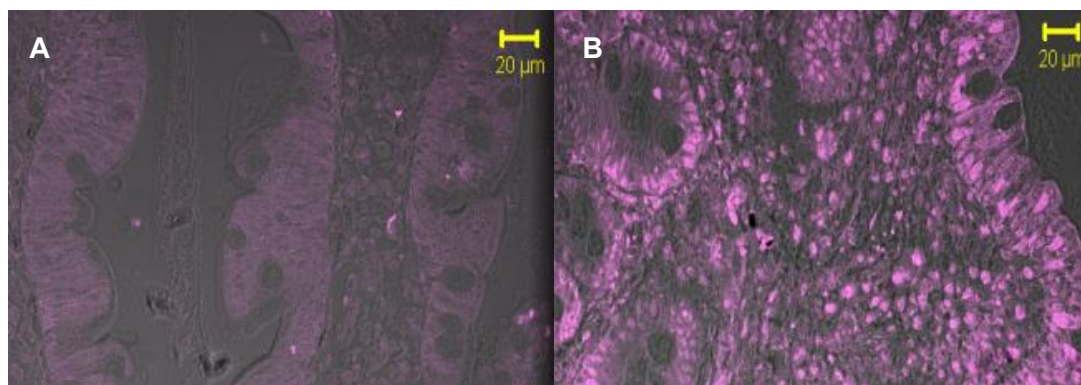


Figura 8. Expresión de IL-15R α en células de la mucosa intestinal. Imágenes representativas del análisis por microscopía confocal de fluorescencia empleando un anticuerpo anti-IL15R α en cortes histológicos de piezas de mucosa intestinal de **A.**- muestra control y **B.**- enteropatía severa. Magnificación 100x.

Por otro lado, se evaluó la presencia de células productoras de IL-15 en cortes de biopsias con enteropatía severa (pacientes celíacos al diagnóstico) y en controles sin enteropatía, mediante microscopía confocal. Observamos que las células IL-15⁺ se localizan en la *lamina propria*, siendo muy escasas en intestino delgado de individuos control (**Figura 9B**) y más frecuentes en EC activa (**Figura 9C**). En enteropatía hemos encontrado con frecuencia que las células IL-15⁺ tienden a localizarse próximas a la región subepitelial. El recuento celular es significativamente superior en el caso de los celíacos (**Figura 9A**).

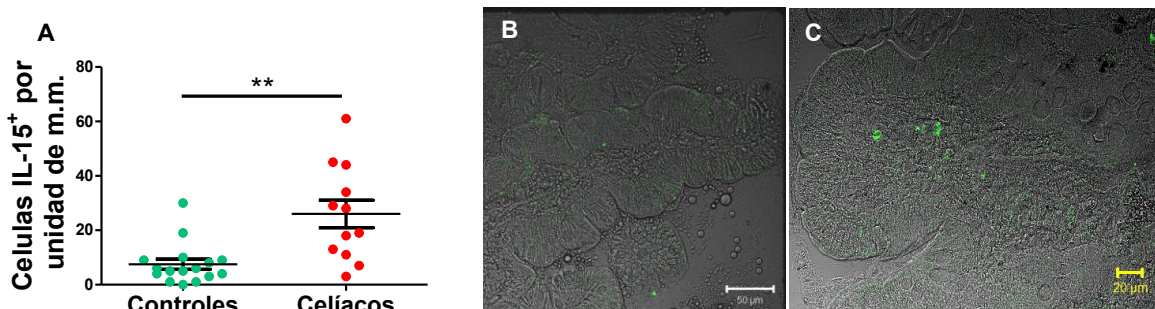


Figura 9. Células productoras de IL-15 en mucosa intestinal. A.- Número de células IL-15⁺ en mucosa intestinal por unidad de muscularis mucosae en controles (n=16) y enteropatía severa (n=12) (p=0,0017, test de Mann-Whitney). Imágenes representativas del análisis por microscopía confocal de fluorescencia en mucosa control (**B**) y en mucosa con enteropatía severa (**C**).

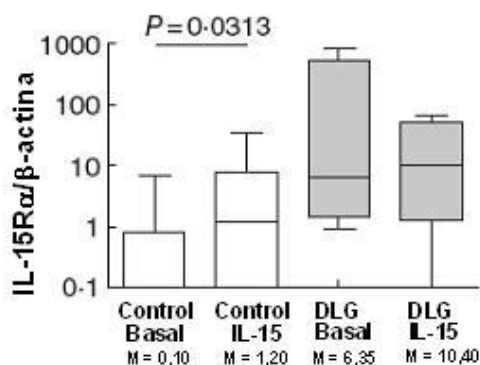
La expresión de IL15R α en duodeno es inducida por estimulación con IL-15.

Con el objeto de estudiar la regulación de la expresión de IL-15R α se realizaron estudios funcionales para evaluar la capacidad de IL-15 de modular la expresión de IL-15R α en biopsias de controles no celíacos y de celíacos en dieta libre. Se utilizó la técnica de cultivo de biopsias duodenales, ya descrita en el capítulo 2, en condiciones basales sin estimulación, luego de lo cual se extrajeron las proteínas totales y se determinó presencia de IL-15 por western blot. Se encontró producción basal de IL-15 solo en un caso (paciente celíaco), el cual fue separado del estudio para asegurarnos de medir sólo la respuesta a IL-15 exógena (**Figura 10**). Se procedió entonces a la estimulación con IL-15 de biopsias de pacientes celíacos en dieta libre de gluten y controles no celíacos. Luego de 3 horas de estímulo con la citoquina y 21 horas adicionales solo con medio de cultivo. La expresión de IL15R α sólo se incrementó en pacientes controles no celíacos (condiciones basales mediana 0,100U; estimulación con IL-15 mediana 1,204U; P=0,0313), pero no en celíacos (condiciones basales mediana 6,350U; estimulación con IL-15 mediana 10,400U; P=n.s.) (**Figura 11**).



Figura 10. Producción basal de IL-15 en duodeno. Análisis de la expresión basal de IL-15 en biopsia entera mediante Western blot. Esquema representativo del análisis de todos los pacientes sometidos al estudio. Se muestra el resultado luego de someter a las piezas a cultivo basal (sin estímulos) durante 24hs. Se analizaron pacientes control (calles 1-3) y pacientes celíacos en dieta libre de gluten (calles 4-6). C: calle correspondiente a IL-15 humana recombinante. No se observaron niveles detectables de IL-15 en pacientes control, mientras que uno de siete pacientes celíacos en DLG mostró niveles detectables de IL-15 (calle 6).

A.



B.

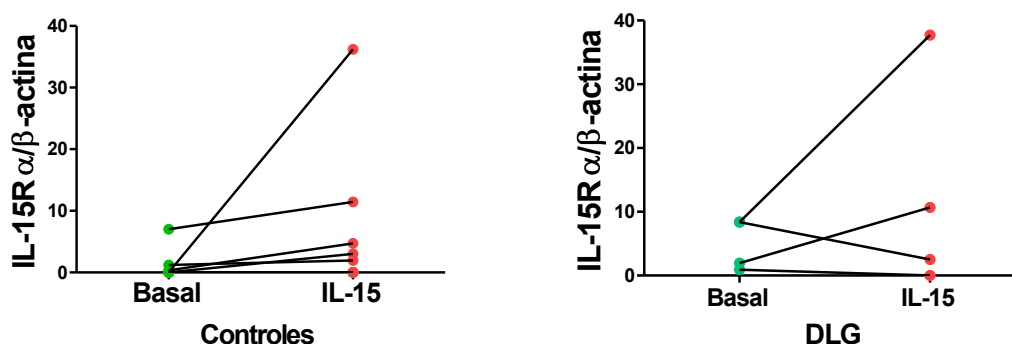


Figura 11. Inducción de IL-15R α por IL-15. A. Análisis de la expresión de mRNA de IL-15R α , relativa a β -actina, luego de 24 horas de cultivo de biopsias duodenales (cultivo basal y con estimulación por IL-15: 3hs de estimulación + 21hs posteriores sin estímulo). Se estudiaron 10 pacientes controles y 6 pacientes en DLG. El análisis estadístico se realizó utilizando el test pareado de Wilcoxon, se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. (M: Mediana). B. Análisis pareados de los datos mostrados en A. separados en los grupos control y DLG.

Relación entre mediadores inflamatorios y la expresión diferencial del IL15R α .

En el estudio de expresión a nivel de RNAm hemos observado que, en pacientes del grupo control, la expresión de IL-15R α seguía una distribución bi-modal. En un grupo de muestras se encontraron valores elevados, en el rango de los observados para los enfermos celíacos al diagnóstico. Dichos pacientes control son, en este caso, adultos que concurren a la consulta gastroenterológica por presentar signos y/o síntomas asociados a patología y que luego de los controles clínicos y estudios pertinentes (en los que se incluye la biopsia diagnóstica) se excluye EC.

Para estudiar la distribución de la expresión de IL-15R α en población no celíaca se tomó un grupo de 40 pacientes adultos controles sanos con serología negativa y biopsia normal sin alteraciones histológicas asociadas a EC. Se determinó el nivel de expresión de IL-15R α (RNAm) en dicha población por RT-PCR cuantitativa. En base a los resultados obtenidos se separaron tres grupos de muestras (aquellas con alta, baja y nula expresión de IL-15R α) (**Figura 12**). A continuación se evaluó el nivel de expresión de IFN γ e IFN γ R en los subgrupos definidos por la expresión de IL-15R α (**Figura 13**).

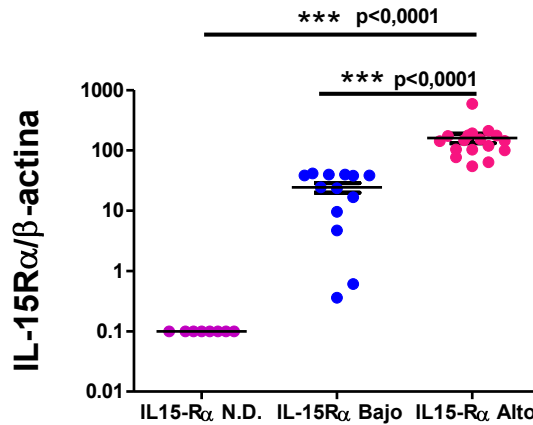


Figura 12: Diferencia en los niveles de expresión de IL-15R α en duodeno de población control. Niveles de RNAm de IL-15R α en unidades arbitrarias (U) relativas a la expresión de β -actina, en biopsias duodenales de pacientes controles no celíacos (n=39). En base a los niveles de IL-15R α , la población de muestras de controles se dividió en tres grupos definidos como alta (n=18), baja (n=13) y expresión no detectable (n=8). Los pacientes pertenecientes al grupo no detectable poseen resultados que caen por debajo del límite de detección del método empleado. Análisis estadístico mediante el test de Kruskal Wallis: *** p \leq 0,0001, seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns *** p \leq 0,0001.

El grupo con alta expresión de IL-15R α presentó un aumento significativo en la expresión relativa de IFN γ R con respecto al grupo de expresión no detectable de IL15R α o con baja expresión (**Figura 13B, 13C**). Si bien el nivel de expresión de IFN γ en los tres grupos analizados no presentó diferencias significativas, existe una marcada tendencia inversa en el eje IFN γ /IFN γ R ya que se observaron valores más bajos de IFN γ para los niveles más altos de IFN γ R. Se podría pensar que existe un efecto de regulación negativa, donde los niveles aumentados de IFN γ se asocian con menores niveles de los receptores de IFN γ e IL-15.

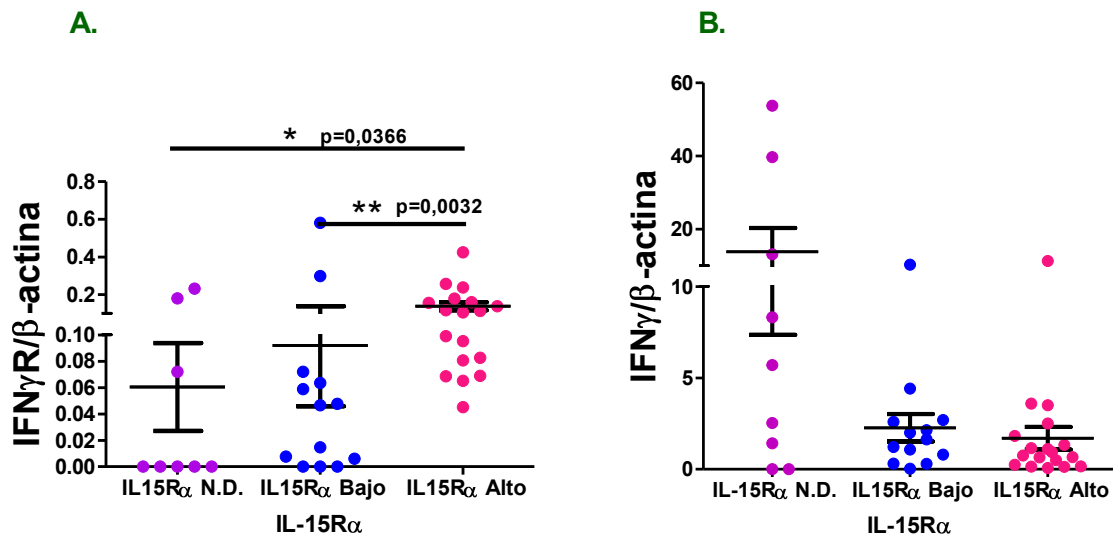


Figura 13: Expresión de IFN γ R e IFN γ en relación a la expresión de IL-15R α . Determinación de la expresión de IFN γ R e IFN γ por PCR cuantitativa en biopsias duodenales de pacientes controles no celíacos separados de acuerdo al nivel de expresión de IL-15R α en alta (n=18), baja (n=13) y expresión no detectable (n=8). Los niveles de expresión del RNAm se muestran en unidades arbitrarias (U) relativas a la expresión de β -actina. **A:** Expresión de IFN γ R. **B:** Expresión de IFN γ , (test de Kruskal Wallis: ** p=0,0063, seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns: * con p<0,05).

Participación de STAT1 en la señalización por IFNs.

STAT1 es un factor de transcripción encargado de promover la transcripción de genes en respuesta a IFN de tipo I (IFN α/β) y tipo II (IFN γ). Está claro que IFN γ es una citoquina central en el daño a la mucosa, en cambio los IFN de tipo I parecen ser claves tanto en las etapas más tempranas como en el mantenimiento de la fase crónica (Jabri and Sollid 2013). Ante la modulación diferencial de la expresión de IFN γ R en función de la activación del eje IL-15/IL-15R α , decidimos estudiar si la vía de IL-15/IL-15R α es capaz de modular la expresión de STAT1. El análisis por PCR cuantitativa mostró que en individuos control con expresión detectable de IL-15R α , la expresión de STAT1 es significativamente menor que en aquellos que no muestran expresión de IL-15R α (**Figura 14**). Esto está en acuerdo con los resultados comentados anteriormente. Dado que existe una relación funcional directa entre la vía de STAT1 e IFN γ (existe mayor expresión de STAT1 en aquellas muestras que presentan mayores niveles de IFN γ). A su vez, esto tiene como consecuencia que, en mucosa duodenal en individuos control, en presencia de señalización activa en la vía de IL-15/IL-15R α la vía de IFN γ /STAT1 se encuentra regulada negativamente.

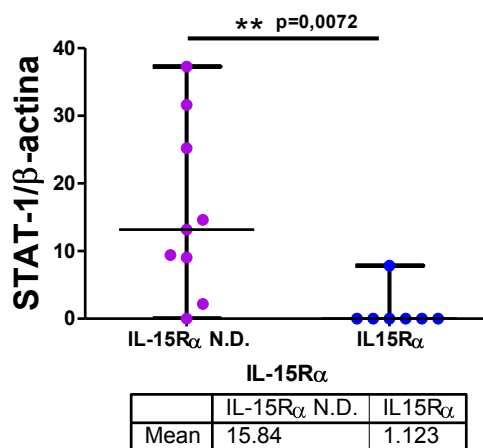


Figura 14. Expresión relativa de STAT1 en duodeno en relación a la expresión de IL-15R α . Determinación de la expresión en mucosa duodenal de STAT1 por PCR cuantitativa en controles no celíacos separados en función de su nivel de expresión de IL-15R α , se analizaron 7 controles con expresión de IL-15R α y 9 con expresión no detectable. Los niveles de expresión del RNAm se muestran en unidades arbitrarias (U) relativas a la expresión de β -actina. (U-test de Mann-Whitney ** p=0,0072). Para mejor comprensión se expresan los valores de las medianas.

Estudio de FoxP3 como marcador de la función regulatoria.

Consideramos relevante el estudio de FoxP3 y su relación con el eje IL-15/IL-15R α en mucosa duodenal normal, dado que ha sido descrito que el número de linfocitos Treg está aumentado en EC activa (Gianfrani *et al.*, 2006) y que la señalización por IL-15 inhibe la función regulatoria (Benahmed *et al.*, 2007). La evaluación de la expresión de FoxP3 en mucosa duodenal de controles no celíacos con alta expresión de IL-15R α mostró alta expresión de FoxP3 con respecto a controles sin expresión de IL-15R α (**Figura 15**). Estos resultados correlacionan con la interpretación que en tejido sano, donde la vía inflamatoria está activada (en nuestro caso con mayores niveles de IL15R α e IFN γ R), existe un mecanismo compensatorio que incrementa los niveles de regulación.

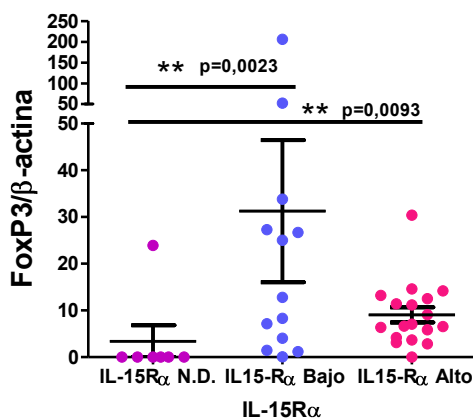


Figura 15. Expresión relativa de FoxP3 en duodeno en relación a la expresión de IL-15Rα. Expresión de FoxP3 en biopsias de pacientes controles no celíacos separados en función de su nivel de expresión de IL-15Rα en alta (n=18), baja (n=13) y expresión no detectable (n=8). Los niveles de expresión del RNAm se muestran en unidades arbitrarias (U) relativas a β-actina. (test de Kruskal Wallis: ** p=0,0048, seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns: * y **, con p<0,05 y 0,01 respectivamente).

Relación del eje IL-15/IL-15Rα con la presencia de células iNKT (Vα24) en mucosa duodenal.

Si bien el rol de las células iNKT en EC se encuentra aún en estudio, se conoce que los pacientes con EC activa presentan un escaso número de células tanto en sangre periférica (Bernardo *et al.*, 2008) como en tejidos (Middendorp and Nieuwenhuis, 2009). Dada su importante relación con mecanismos tanto inflamatorios como homeostáticos nos interesó estudiar si existe relación entre su expresión en tejido y el eje IL-15/IL-15Rα en mucosa duodenal normal. Para esto se evaluó la expresión de Vα24, segmento variable de la cadena α del TcR que es mayoritariamente expresado en la población iNKT.

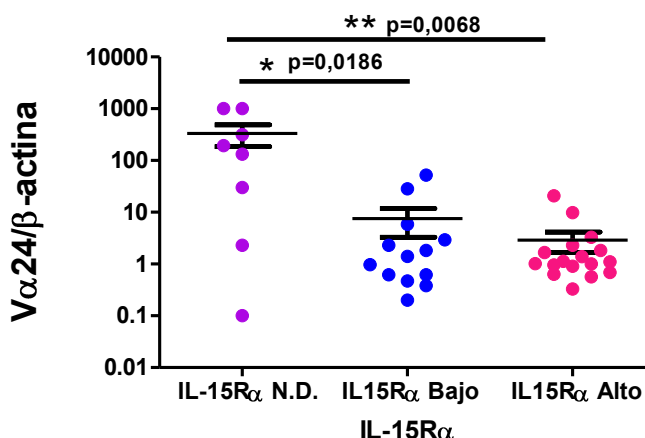


Figura 16. Expresión relativa de Vα24 en duodeno en relación a la expresión de IL-15Rα. Expresión de Vα24 por PCR cuantitativa en biopsias de pacientes controles no celíacos separados en función del nivel de expresión de IL-15Rα en alta (n=18), baja (n=13) y expresión no detectable (n=8). Los niveles de expresión del RNAm se muestran en unidades arbitrarias (U) relativas a β-actina. (test de Kruskal Wallis: * p=0,0165, seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns: *, con p<0,05).

En los pacientes control se observó un aumento significativo de la expresión de RNAm de $V\alpha 24$ en el grupo con expresión no detectable de $IL-15R\alpha$ frente a los grupos con baja y alta expresión del receptor (**Figura 16**). Si bien existe una tendencia a mayores niveles de RNAm de $V\alpha 24$ en el grupo de baja expresión de $IL15R\alpha$, frente al grupo de alta expresión, las diferencias no son estadísticamente significativas. Estos resultados indicarían que existen mecanismos regulatorios tendientes a mantener disminuidos los niveles de células iNKT en mucosas que presentan altos niveles de receptor de IL-15, preservando de esta manera la funcionalidad de la mucosa en individuos no celíacos.

Participación de células $V\alpha 24^+$ en enteropatía activa.

Además, y con la intención de estudiar la presencia de células iNKT en biopsias de pacientes con y sin enteropatía, hemos analizado los niveles de RNAm de $V\alpha 24$ en dos poblaciones independientes de pacientes una local y otra de España.

En el análisis de los pacientes de población española, los celíacos al diagnóstico (celíacos activos) presentaron un incremento en los niveles de expresión de RNAm de $V\alpha 24$ comparado tanto con los pacientes controles no celíacos con inflamación (controles I) como con los pacientes no celíacos sin inflamación (controles C) (**Figura 17A**). Los pacientes celíacos en dieta libre de gluten (DLG) mostraron niveles aumentados de RNAm de $V\alpha 24$ comparado con los controles C. No se hallaron diferencias entre enfermos celíacos activos y en dieta libre de gluten en los niveles de mensajero analizados, lo que sugiere un incremento del número de células iNKT en la mucosa duodenal de ambos grupos. Estos resultados sugieren que los niveles de $V\alpha 24$ (presencia de células iNKT) tal vez no reviertan aún luego de un período de dieta estricta, o que bajos niveles de ingesta de gluten inadvertida serían suficientes para mantener un número elevado de estas células aún cuando la histología se haya normalizado. El análisis en población argentina mostró resultados similares en relación al aumento de los niveles de RNAm de $V\alpha 24$ en pacientes celíacos al diagnóstico comparados con pacientes control (sin inflamación) (**Figura 17B**). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de RNAm de $V\alpha 24$ entre las poblaciones argentina y española, tanto entre los grupos control como entre los celíacos al diagnóstico (no mostrado).

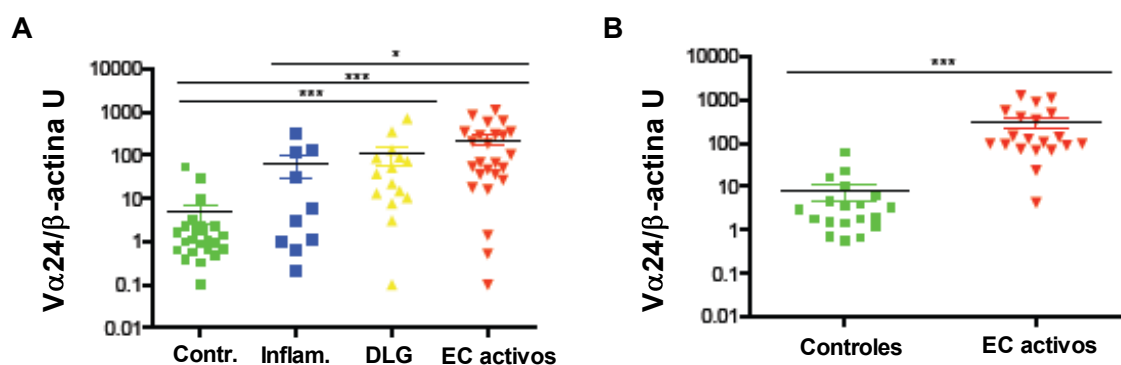


Figura 17. Incremento de la expresión de $V\alpha 24$ en duodeno de pacientes celíacos. Análisis de los niveles de RNAm de $V\alpha 24$ por PCR cuantitativa en biopsias duodenales de pacientes de población española (**A**) y población argentina (**B**). Los grupos de pacientes se definen como se detalla, Contr.: pacientes control no celíacos: población española (n=25); población argentina (n=19), Inflam.: pacientes control con inflamación definida por análisis anatomopatológico (n=10), DLG: pacientes celíacos en dieta libre de gluten (n=14), EC activos: pacientes celíacos al diagnóstico: población española (n=25); población

argentina (n=20). Los niveles de expresión del RNAm se muestran en unidades arbitrarias (U) relativas a β -actina. (test de Kruskal Wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns) (**p <0.001; *p <0.05).

Correlación entre los niveles de expresión de $V\alpha 24$ e $IFN\gamma$ en mucosa duodenal.

Se analizó la expresión de $IFN\gamma$ en mucosa duodenal en los grupos de pacientes argentinos y españoles ya comentados. Como es conocido (León *et al.*, 2007; León *et al.*, 2005), las muestras duodenales de pacientes celíacos (al diagnóstico y en DLG) mostraron expresión aumentada de RNAm de $IFN\gamma$ comparadas con los controles tanto en población española (**Figura 18A**) como en población argentina (**Figura 18B**). A continuación analizamos la correlación entre los niveles de RNAm de $IFN\gamma$ y $V\alpha 24$. Encontramos que existe una correlación positiva entre los niveles de $IFN\gamma$ y $V\alpha 24$ tanto en los pacientes celíacos de población española como en los de población argentina. (**Figuras 18C y D**, respectivamente). En el caso de los pacientes con inflamación observada en el análisis histopatológico no hay correlación entre los niveles de $IFN\gamma$ y $V\alpha 24$, si bien estos pacientes presentan expresión significativamente aumentada de RNAm de $IFN\gamma$ con respecto a los pacientes del grupo control, este aumento no se acompaña en muchos casos de aumento en la expresión de $V\alpha 24$. Estos resultados reforzarían la importancia de la correlación observada para los celíacos dado que el grupo de controles con inflamación es un grupo de etiopatogenia heterogénea.

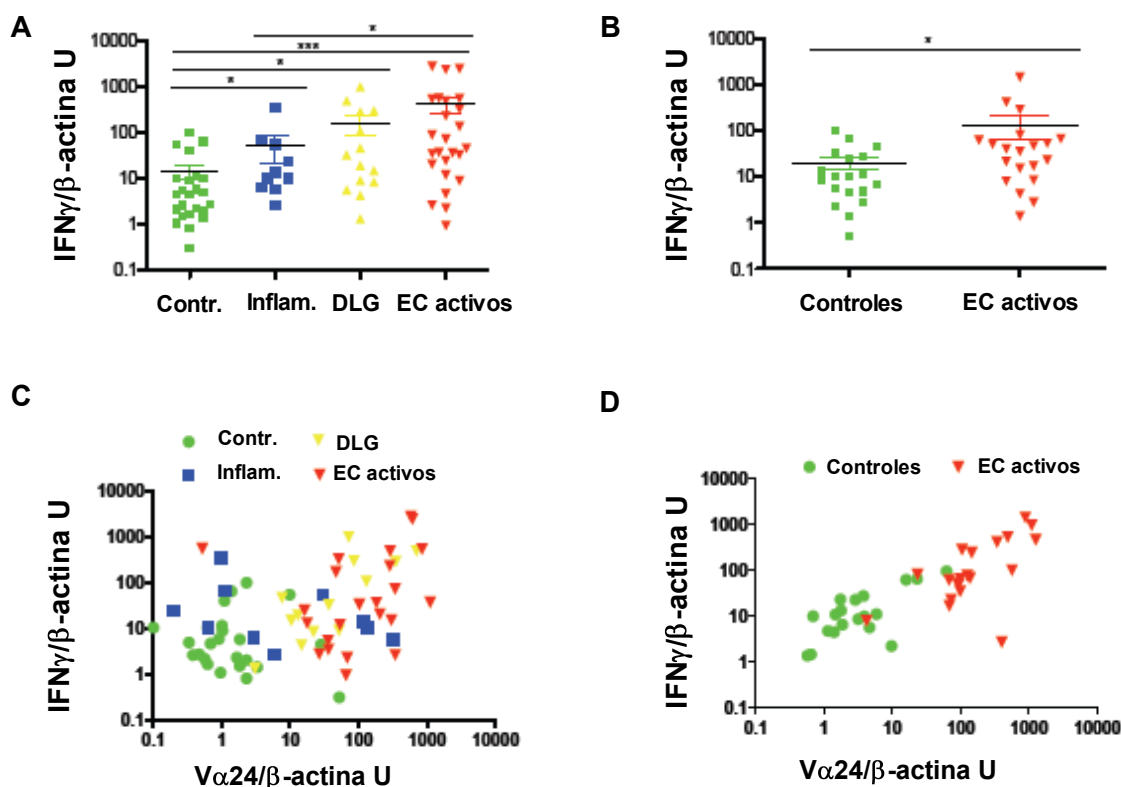


Figura 18. Correlación de la expresión de $V\alpha 24$ e $IFN\gamma$ en mucosa duodenal. Análisis de los niveles de RNAm de $IFN\gamma$ por PCR cuantitativa en biopsias duodenales de pacientes de población española (A) y población argentina (B). Los grupos de pacientes se definen como se detalla, Contr.: pacientes control no celíacos, Inflam.: pacientes control con inflamación definida por análisis anatomopatológico, DLG: pacientes celíacos en dieta libre de gluten, EC activos: pacientes celíacos al diagnóstico. Los niveles de expresión del RNAm se muestran en unidades arbitrarias (U) relativas a β -actina. (test de Kruskal Wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns). (C) y (D): Análisis de correlación entre los niveles de RNAm de $IFN\gamma$ versus $V\alpha 24$ expresados relativos a β -actina en población española y argentina respectivamente, los símbolos y grupos de pacientes

se corresponden a los gráficos previos. (C) Población española: (Contr.: Spearman $r=0.3115$, p valor=n.s; Inflam.: Spearman $r=0.4265$, p valor=n.s; DLG: Spearman $r=0.5393$, p valor<0.05; EC activos: Spearman $r=0.4323$, p valor<0.05) y (D) población argentina (Control: Spearman $r=0.5895$, p valor<0.05; EC activos: Spearman $r=0.6917$, p valor<0.001).

Dado que las células iNKT son capaces de producir grandes cantidades de $IFN\gamma$ en cortos períodos de tiempo (La Cava *et al.*, 2006), nos interesó evaluar si estas células podrían ser una fuente de $IFN\gamma$ en EC. Para investigar esto, se cultivaron *in vitro* biopsias de pacientes en DLG con o sin una suspensión de gliadinas, y se analizaron los niveles de RNAm de $IFN\gamma$ y $V\alpha 24$. Se observó correlación entre la expresión de $IFN\gamma$ y $V\alpha 24$ post estimulación con gliadinas (Figura 19).

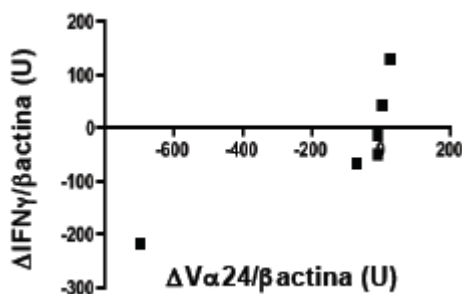


Figura 19. Correlación en los cambios de expresión de $IFN\gamma$ y $V\alpha 24$ en mucosa duodenal. Análisis de correlación del incremento (Δ) en la expresión de $IFN\gamma$ y $V\alpha 24$, en unidades arbitrarias (U) después del cultivo de 8 biopsias de pacientes en DLG con 100 μ g/ml de una solución en etanol 70% de gliadinas (Sigma) en relación al cultivo con medio solo (Spearman $r=0.5164$, $p<0.05$).

Los niveles de expresión de $V\alpha 24$ y FoxP3 en duodeno revelan un perfil particular en enfermedad celíaca.

Anteriormente hemos mostrado el análisis de la expresión de FoxP3 a nivel de RNAm en piezas de biopsia duodenal, como medida indirecta de la presencia de linfocitos Treg. La evaluación realizada sobre muestras de población española y argentina de individuos celíacos y controles mostró que pacientes españoles celíacos (tanto activos como en DLG) presentaron niveles bajos de expresión de FoxP3 comparados con controles sin inflamación evidente (controles C) (Figura 20A). Resultados similares se hallaron en muestras de población argentina (Figura 20B).

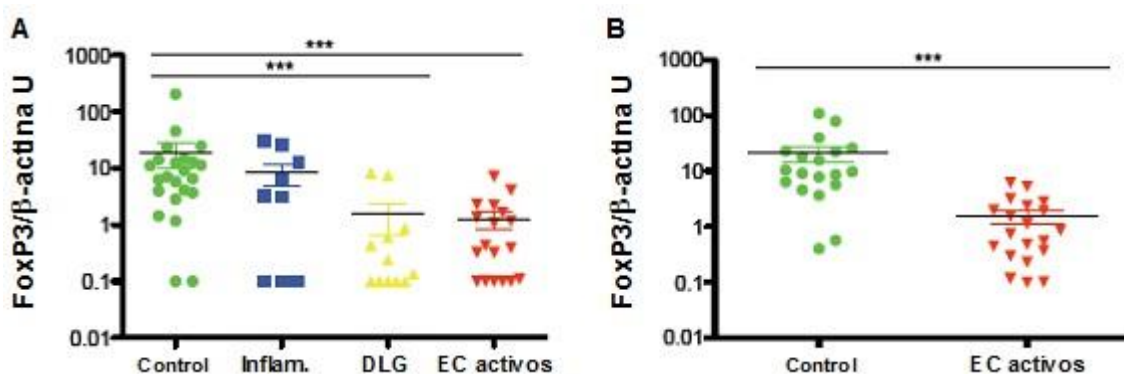


Figura 20. La expresión de FoxP3 está disminuida en duodeno de pacientes celíacos. Análisis de los niveles de RNAm de FoxP3 por PCR cuantitativa en biopsias duodenales de pacientes de población española (A) y población argentina (B). (C: pacientes control no celíacos, I: pacientes control con inflamación definida por análisis anatomopatológico, DLG: pacientes celíacos en dieta libre de gluten, EC activa: pacientes celíacos al diagnóstico). Los niveles de expresión del RNAm se muestran en unidades arbitrarias (U) relativas a β -actina. (test de Kruskal Wallis seguido del post-test de comparación múltiple de Dunns) (** $p < 0.001$).

Por lo tanto, considerando que en población celíaca hemos observado un aumento de los niveles de RNAm de $V\alpha 24$ (**Figuras 17A y 17B**) y una disminución de los niveles de RNAm de FoxP3 (**Figuras 20A y 20B**), decidimos evaluar cual era la distribución de las muestras en función de estos dos parámetros.

El análisis de los niveles de RNAm de FoxP3 y $V\alpha 24$ en biopsias duodenales de población española y argentina mostró que estos dos parámetros correlacionan en forma inversa y que las muestras se distribuyen generando una clara diferenciación entre población control y celíaca. Ambas poblaciones pueden diferenciarse con una sensibilidad del 92% (**Figura 21**). Estos resultados sugieren que esta evaluación podría ser empleada como complemento en casos de falta de correlación o de información en el protocolo de detección diagnóstico convencional. Además, estos resultados revelarían una vinculación entre la expresión de Foxp3 y la presencia de células $V\alpha 24$, estudios posteriores intentarán profundizar los mecanismos que conectan las células iNKT con la expresión de FoxP3.

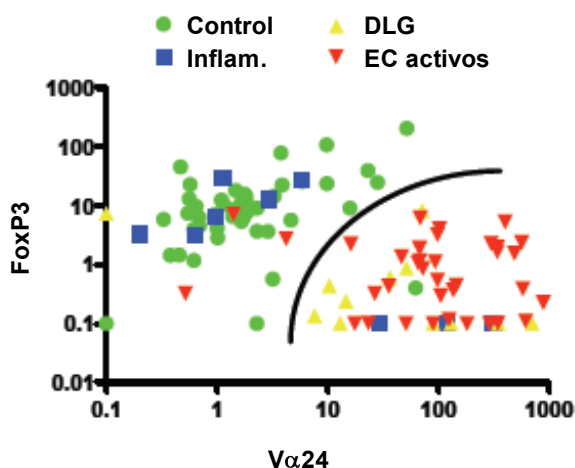


Figura 21. Correlación de los niveles de FoxP3 versus $V\alpha 24$ en duodeno. Análisis de los niveles de RNAm de FoxP3 versus $V\alpha 24$ por PCR cuantitativa en biopsias duodenales de pacientes de población española y población argentina. Valores expresados en unidades arbitrarias (U) (C: Spearman $r=0.3495$, $p<0.05$; I: Spearman $r=-0.4577$, $p=n.s$; DLG: Spearman $r=-0.4858$, $p<0.05$; EC activa: Spearman $r=-0.056$, $p=n.s$).

Discusión.

La mucosa duodenal en EC activa presenta un aumento de los niveles de citoquinas del perfil Th1 con predominio de $\text{IFN}\gamma$, pero ausencia de IL-12 (principal inductor Th1), lo que plantea algunos interrogantes en la inmunopatogenia de EC. El conocimiento de los mecanismos que llevan al daño en la enteropatía, con las correspondientes vías de señalización involucradas resulta de fundamental importancia a la hora de estudiar estrategias terapéuticas capaces de bloquear o modular esta respuesta inmune agresiva para el intestino delgado. Sin embargo, la falta de un modelo animal que reproduzca en forma completa las características de EC, hacen que la evaluación de expresión mediante técnicas de microscopía, citometría de flujo o PCR cuantitativa de piezas de biopsias duodenales o el cultivo de explantes de biopsias duodenales representen las estrategias experimentales más empleadas para estudiar los mecanismos celulares y moleculares responsables del desarrollo y cronificación de la lesión intestinal. Los ensayos *ex vivo* permiten realizar estudios funcionales, utilizando diferentes estímulos capaces de reproducir las condiciones habituales a las que se somete la mucosa intestinal en presencia de péptidos derivados de gluten.

Como ya hemos mencionado, algunos aspectos en la patogenia de EC no se conocen. Si bien sabemos que varios mediadores inflamatorios como $\text{IFN}\gamma$, IL-15, entre otros, tienen un rol crítico, para muchos otros la información es más limitada. IFNs tipo I, $\text{TNF}\alpha$, e IL-23, están directamente vinculados a la diferenciación, expansión y perpetuación de las células Th1 y Th17, pero su producción y regulación en la mucosa del intestino delgado no ha sido caracterizada. Todas estas citoquinas pueden ser producidas por diferentes células pero, en particular, las CD son una fuente principal de producción.

El bajo número de CD en el tejido y el bajo rendimiento de aislamiento por "cell sorting" o separación magnética implica que para realizar estudios funcionales se requiera el empleo de un número muy elevado de piezas de biopsias. Esto no resulta posible por aspectos éticos de los proyectos de investigación.

Por este motivo nos interesó evaluar la presencia y localización de CD en mucosa de intestino delgado. Para esto analizamos cortes de biopsias duodenales mediante microscopía confocal de fluorescencia usando el marcador CD11c. Aunque este marcador no es expresado por todas las CD humanas es sumamente útil para la caracterización cuando se emplean técnicas de microscopía en cortes en parafina.

En este trabajo, describimos la distribución de las CD CD11c^+ en mucosa duodenal sana y con enteropatía. Las imágenes obtenidas muestran que en *lamina propria*, las células CD11c^+ se encuentran tanto dispersas como agrupadas, siendo frecuente esta última disposición en mucosa con EC, y también que se las encuentra comúnmente próximas al epitelio (**Figura 2**). En base a las imágenes de microscopía confocal evaluamos el número de células CD11c^+ en la mucosa duodenal. A diferencia de lo descrito por Jabri y Sollid (Jabri and sollid, 2013), quienes asumen que en la *lamina propria* en EC hay una mayor densidad de CD, junto con el aumento de otros tipos celulares como células plasmáticas y linfocitos T CD4^+ , nosotros encontramos que no hay diferencias en el número de células CD11c^+ en mucosa cuando se compara tejido control con enteropatía severa (**Figura 3**).

Si bien se acepta que en EC existe una polarización hacia la vía Th1, al no ser ésta dependiente de IL-12, se proponen otras vías alternativas que llevan a disparar los mecanismos de

inflamación y remodelamiento de la mucosa intestinal. En este sentido, las citoquinas asociadas al perfil Th17 han mostrado ser parte del mecanismo inmunopatogénico observado en mucosa celíaca (Monteleone *et al.*, 2010). Las células Th17 podrían ser responsables de muchos de los efectos patogénicos antes atribuidos únicamente a las células Th1.

Para estudiar la vía IL-23/Th17 se evaluó la presencia de células productoras de IL-23 por microscopía confocal en muestras de duodeno de pacientes celíacos al diagnóstico y de controles no celíacos. Las células productoras de IL-23 se marcaron como IL-23p19⁺ y mostraron una distribución en el tejido claramente diferente entre mucosa control y con enteropatía (**Figura 4**). En mucosa control, las células IL-23p19⁺ se hallaron asociadas a la zona de criptas, mientras que en mucosa celíaca se las evidenció en regiones pericripticas y ocasionalmente en vellosidades. Hasta la fecha no se han publicado datos sobre el número de células productoras de IL-23 en tejido con y sin enteropatía ni de la distribución diferencial de dichas células asociada a patología. Estos datos podrían sugerir que diferentes vías de reclutamiento o activación estarían activas en las diferentes condiciones analizadas. Las imágenes obtenidas sugieren que el número de células IL-23p19⁺ es mayor en enteropatía que en tejido control. Si bien no hemos logrado imágenes de calidad aceptable en estudios de colocalización con marcadores para CD; por su morfología y capacidad de producir esta citoquina muy probablemente estas células correspondan a CD.

En acuerdo con lo publicado por Monteleone (Monteleone I *et al.*, 2010) quien ha descrito la inducción a nivel de RNAm de IL-17 en células aisladas de biopsias duodenales de pacientes en DLG sometidas a incubación con un digesto péptico/tríptico de gliadinas; en nuestro estudio observamos un aumento en la expresión de RNAm para IL-17 en mucosa celíaca al diagnóstico comparada con controles no celíacos (**Figura 5A**). Si bien no observamos un aumento del número de células productoras de IL-17 entre controles y biopsias con EC, mostramos por inmunofluorescencia con análisis confocal la diferente distribución de las células IL-17⁺ en *lámina propia* y en el compartimiento intraepitelial, en ambas situaciones, lo que hasta la fecha no había sido aún documentado (**Figura 5C**). Si bien estas células son relativamente frecuentes en mucosa intestinal no celíaca, se las halló localizadas en la *lamina propria* pericriptica; en cambio, en enteropatía severa las células IL-17⁺ se observaron más frecuentemente en la zona de *lamina propria* subluminal, observándose las también en el compartimiento epitelial. Estos resultados nos podrían sugerir aquí también que diferentes vías de reclutamiento o diferenciación/activación estarían activas en EC.

Nuestros resultados de expresión de IL-21 a nivel de RNAm en mucosa control y celíaca (**Figura 6**) coinciden con los publicados por Fina (Fina *et al.*, 2008). Hemos observado un aumento significativo de la expresión de IL-21 en el caso de mucosa con enteropatía. Sabemos además que IL-21 es producida por linfocitos T CD4⁺ de pacientes celíacos en respuesta a péptidos derivados de gluten (Bodd *et al.*, 2010) cuestión no observada para IL-17. IL-21 ejerce funciones solapadas con IL-15 en cuanto a la producción de IFN γ , citotoxicidad, proliferación celular, y supervivencia de poblaciones NK y linfocitos T CD8⁺. De hecho en un estudio en ratones NOD se probó que linfocitos T CD4⁺ que producen IL-21 y expresan el receptor de homing intestinal CCR9 pueden ir a páncreas y promover daño tisular mediado por linfocitos T CD8⁺ (McGuire *et al.*, 2011). Esta citoquina estaría implicada en la proliferación y función de los linfocitos T y células NK y en la diferenciación de Linfocitos B a células memoria o plasmáticas (Leonard WJ & Spolski R, 2005), además haría que los linfocitos T sean resistentes a los efectos de las células T regulatorias FoxP3⁺ (Peluso *et al.*, 2007). Por su rol

central en los mecanismos de patogenia, su estudio en el contexto de la enteropatía es fundamental para continuar profundizando sobre sus múltiples funciones y efectos.

Como mencionamos, varias evidencias experimentales demuestran la importancia del eje IL-15/IL-15R α en la patogenia de EC. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el estudio de la expresión y actividad de IL-15 en el tejido resulta particularmente difícil. Por un lado, IL-15 presenta varios niveles de control de su actividad biológica. Es sintetizada y almacenada y, luego de liberada, se asocia a su receptor en membrana. Estos cambios no pueden ser detectados por técnicas convencionales de análisis de expresión. La medida de los niveles de RNAm no correlaciona con su actividad biológica. Además, la detección de la proteína por técnicas como westernblot no siempre permite obtener resultados claros, fundamentalmente en tejido. Por lo expuesto, destacamos que, en este trabajo, se han utilizado distintas estrategias para la evaluación tanto de IL-15 como de su receptor con el fin de caracterizar el rol de este eje en la patología.

En coincidencia con otros autores, no hemos evidenciado cambios de expresión del nivel de RNAm de IL-15 en mucosa con EC (no mostrado); pero sí mayor expresión de IL-15 a nivel de la proteína en mucosa duodenal de pacientes celíacos, comparado con controles no celíacos. Además, en este trabajo, a partir de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia, se realizó un recuento de las células productoras de IL-15 en mucosa duodenal, encontrando que claramente existe un incremento en enteropatía comparado con tejido de controles no celíacos (**Figura 9**).

A su vez, demostramos que IL-15R α se encuentra sobre-expresado en mucosa duodenal en EC, tanto en pacientes con ingesta normal como aquellos en DLG. Esto se observa en biopsia entera tanto a nivel de RNAm (**Figura 7**) como de proteína (**Figura 8**). El análisis de las imágenes sugiere que, por morfología y localización, las células IL-15R α ⁺ corresponderían a distintos tipos celulares y que estos se encuentran tanto en *lamina propria* como en el compartimiento epitelial.

Estos resultados nos llevan a proponer que en EC, el eje IL-15/IL-15R α está sobreestimulado con un aumento del número de células productoras de IL-15 en mucosa duodenal y un aumento del número de células que expresan el receptor de IL-15. Proponemos que este aumento en el número de células IL-15R α ⁺ puede asociarse a un menor umbral de respuesta a IL-15 en pacientes con EC tanto activos como en DLG, y que este podría ser un evento temprano en EC. Los pacientes celíacos serían entonces más respondedores a menores niveles de IL-15, hecho que asociado a la presencia de péptidos derivados de gluten y otros disparadores ambientales determinarían el inicio de la patología.

Nuestros resultados permiten explicar la función biológica exacerbada de IL-15 en mucosa celíaca con niveles mantenidos de su RNAm. De este modo, IL-15 sería retenida en la superficie de diferentes células que expresan su receptor y se perpetuaría su función biológica como consecuencia de la expresión aumentada de IL-15R α en mucosa duodenal de pacientes celíacos.

En el estudio funcional que realizamos en biopsia entera de pacientes control no celíacos y celíacos en DLG (**Figura 11**) corroboramos que los niveles de receptor son mayores en celíacos aunque estén en DLG. En la incubación de las piezas de biopsias con y sin IL-15 exógena, observamos inducción significativa del RNAm de IL-15R α en presencia de IL-15 en controles pero no en los pacientes en DLG. La falta de inducción del receptor en presencia de IL-15 tal vez se deba a que el eje de inducción se encuentre saturado en mucosa celíaca con los niveles de IL-15 endógena

a los que están sometidas las células de la mucosa o tal vez, existan mecanismos regulatorios actuando en celíacos en dieta libre tendientes a inhibir la mayor expresión del receptor para mantener la integridad de la mucosa.

Hemos observado que, de acuerdo a los niveles de RNAm de IL-15R α , la población no celíaca se puede separar en tres grupos, uno con expresión no detectable, otro con baja expresión y un tercero con alta expresión, comparable a los niveles observados en mucosa con enteropatía o de pacientes celíacos en DLG (**Figura 12**). Este resultado apoya la idea de que existe una subpoblación de pacientes no celíacos con mayor sensibilidad a IL-15, o menor umbral de respuesta a esta citoquina. Estos pacientes tendrían también menor umbral de respuesta a IFN γ , dado que correlacionan con una alta expresión a nivel de RNAm de IFN γ R (**Figura 13**). Si bien los niveles de RNAm de IFN γ no son estadísticamente diferentes en los grupos analizados, siendo todos del orden de lo observado en pacientes no celíacos, se observa un efecto de regulación negativa que permite disminuir el umbral de respuesta a IL-15 e IFN γ en presencia de mayores niveles de IFN γ . Sabiendo que IFN γ se induce, principalmente, por actividad de la vía de STAT-1, en mucosa duodenal no celíaca con señalización activa en IL-15/IL-15R α , consideramos que la vía de STAT-1/IFN γ estaría regulada negativamente para evitar la inducción de mecanismos de daño (**Figuras 13 y 14**).

En el análisis de la expresión de FoxP3 y V α 24 a nivel de RNAm en individuos de población control se observó una diferencia significativa entre el grupo con expresión no detectable de IL-15R α y los grupos con expresión baja y alta. Los grupos con expresión de IL-15R α mostraron niveles significativamente mayores de expresión de FoxP3 (**Figura 15**) y significativamente menores de expresión de V α 24 (**Figura 16**). Esto apoyaría los resultados anteriores mostrando que, en aquellos pacientes donde observamos mayor expresión de IL-15R α , con menor umbral de respuesta a IL-15 y mayores niveles de expresión de IFN γ R, se inducirían mecanismos activos compensatorios de regulación que permitirían preservar la funcionalidad de la mucosa, junto con un menor número de células iNKT.

El análisis de las células iNKT circulantes en los pacientes con EC, ha mostrado resultados contradictorios en bibliografía. Mientras que Grose ha descrito un déficit numérico y funcional de células iNKT en sangre periférica en los pacientes con EC, tanto en actividad como aquellos en DLG (Grose *et al.*, 2007a), Bernardo ha mostrado que los pacientes con EC activa, tanto niños como adultos, presentan niveles normales de células iNKT comparables con los encontrados en el grupo control sano (Bernardo *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con otros previamente publicados (Van der Vliet *et al.*, 2001).

En este trabajo, se estudió la expresión de V α 24 en biopsias de pacientes tanto celíacos (en DLG y al diagnóstico) como no celíacos (controles con y sin inflamación de la mucosa duodenal) de dos poblaciones independientes, española y argentina (**Figura 17**). Encontramos un aumento de expresión del mensajero de V α 24, que asociamos a un aumento del número de células iNKT, en mucosa duodenal en celíacos, independientemente del consumo de gluten, comparado con los grupos control. En este sentido, las células iNKT podrían comportarse en forma similar a los LIEs γ/δ en mucosa duodenal en EC, para los que no se observa una reducción significativa en el número aún en pacientes en DLG con normalización histológica. Este hecho puede deberse al consumo

inadvertido de muy bajas cantidades de gluten o a fenómenos crónicos de activación de la respuesta inflamatoria que se desconocen.

En contraposición a nuestros resultados, Grose encontró un porcentaje reducido de células iNKT en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos, comparados con controles, determinado mediante qPCR (Grose *et al.*, 2007; Grose *et al.*, 2008) y por inmunofluorescencia (Grose *et al.*, 2007). Una diferencia entre ambos estudios es en el análisis estadístico de los datos, ya que en este trabajo, las células iNKT no presentaban una distribución normal y por ello se realizaron análisis no-paramétricos, mientras que en el trabajo de Grose se aplicó una estadística paramétrica. Sin embargo, consideramos válidos nuestros resultados que provienen de un estudio colaborativo realizado sobre poblaciones independientes de pacientes.

Por otro lado, el incremento de la expresión del RNAm de $V\alpha 24$ encontrado en duodeno de pacientes celíacos también correlaciona con la expresión de $IFN\gamma$ tanto en biopsias sin estímulo como estimuladas *in vitro* con gliadinas dando mayor consistencia a nuestros resultados (**Figuras 18 y 19**). Somos conscientes de que la expresión de la cadena TCR $V\alpha 24$ no es exclusiva de las células iNKT y por lo tanto, podríamos estar identificando otros tipos de células, sin embargo, consideramos que esta es la estrategia más adecuada, al menos por el momento, ya que el análisis de la molécula $V\alpha 24$ es más restrictivo que el de $V\beta 11$ (Bernardo *et al.*, 2008; Van der Vliet *et al.*, 2004). De hecho, la identificación de células iNKT por la expresión de RNAm se ha propuesto como una alternativa más confiable que el estudio de la co-expresión de CD3 y CD161, debido a que los linfocitos T intraepiteliales (no NKT) pueden inducir la expresión de CD161 tras su activación (Wingender and Kronenberg, 2008).

Nuestras observaciones destacan la presencia incrementada de células iNKT en mucosa duodenal en celíacos, independientemente de la dieta. Sabemos que estas células, tras su activación, adquieren rápidamente actividad citotóxica y producen $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$, y algunas iNKT pueden producir IL-17 (Coquet *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2007). La producción de grandes cantidades de estas citoquinas luego de ser estimuladas (Zeissig *et al.*, 2007); sugiere que estas células son capaces de condicionar el microambiente; y en el caso de EC pueden contribuir a una respuesta temprana con producción de $IFN\gamma$. Se considera que los ligandos naturales de las células iNKT son glicolípidos liberados de los enterocitos luego de eventos de apoptosis o necrosis (Brennan *et al.*, 2011). Esto generaría un ciclo de auto-amplificación que aumentaría, en presencia de IL-15, la capacidad citotóxica de estas células y, en consecuencia, desencadenaría mayor muerte de enterocitos (Gill N *et al.*, 2005).

Apoyando esta hipótesis, probamos que existe correlación entre la expresión de $V\alpha 24$ y la producción de $IFN\gamma$ en celíacos independientemente del consumo de gluten en las dos poblaciones estudiadas (**Figura 18**). Asociado a este modelo, también probamos que la correlación entre la expresión a nivel de RNAm de $V\alpha 24$ e $IFN\gamma$ se mantiene en biopsias de pacientes en DLG con incubación con un digesto de gliadinas (**Figura 19**).

Se ha propuesto también que las células iNKT podrían tener un efecto en el desarrollo de células dendríticas tolerogénicas, las que inducirían células T regulatorias (Shevach EM *et al.*, 2001). Sin embargo, de acuerdo a nuestras observaciones, en un microambiente con fuerte señalización vía IL-15/IL-15R α con contribución de IL-21, y mecanismos de estrés disparados en la mucosa, las

células iNKT parecerían contribuir más a la generación de un perfil proinflamatorio, con producción de $\text{IFN}\gamma$.

Observamos que la expresión de FoxP3 en mucosa intestinal de pacientes celíacos tanto al diagnóstico como en DLG está disminuida comparada con el grupo control sin inflamación, en ambas poblaciones estudiadas (**Figura 20**). Estos resultados correlacionan con la hipótesis de que, como consecuencia del microambiente en la mucosa duodenal en EC, la población Tregs está disminuida y/o alterada funcionalmente (Jabri and Sollid, 2009) debido a la presencia de IL-15 que afecta la señalización de $\text{TGF}\beta$ (Benahmed *et al.*, 2007; Benahmed *et al.*, 2009), o por la combinación de IL-15 y ácido retinoico que inhibiría la generación de células Treg, aunque este mecanismo no ha sido completamente dilucidado (DePaolo *et al.*, 2011).

Finalmente, encontramos que la evaluación de los niveles de RNAm de $V\alpha 24$ y FoxP3 define un perfil molecular asociado a EC (**Figura 21**). Esta observación podría tener utilidad en el diagnóstico de EC para aquellos casos en los que no se puede llegar a una conclusión definitiva por falta de información o de correlación en la información disponible.

Conclusiones.

En este capítulo hemos focalizado la atención en diferentes elementos claves de la respuesta inmune de la mucosa duodenal frente a péptidos derivados de gluten. Si bien no hemos observado un cambio en el número de células dendríticas, en la mucosa en EC activa evidenciamos cambios en la localización respecto al tejido normal. Esto se asoció con un aumento y cambios de localización en células que producen IL-23. Y también, asociado a esta citoquina encontramos un aumento en células IL-17⁺ con una distribución diferencial en EC activa. Encontramos además niveles más elevados de RNAm de IL-21. Observaciones que, en conjunto, sugieren la participación del perfil Th17 en EC.

Hemos profundizado el conocimiento sobre la funcionalidad del eje IL-15/IL-15R α . Observamos la existencia de un menor umbral de respuesta a IL-15 en EC, tanto en aquellos pacientes al diagnóstico como en los que se encuentran en dieta. Debido a la asociación con su receptor en membrana celular, los cambios en la actividad biológica de IL-15 no necesariamente se acompañan de cambios en los niveles de RNAm. De manera relevante, identificamos poblaciones de individuos no celíacos que tienen diferentes niveles de expresión del receptor de IL-15 y observamos que esto determina una respuesta diferencial. De hecho, para mantener la homeostasis en la mucosa duodenal con un menor umbral para IL-15 (altos niveles de IL-15R α) es necesario mantener menores niveles de citoquinas y factores de transcripción asociados a daño, como lo son IFN γ y STAT-1, junto con una inducción de células Treg e inhibición de células iNKT. Estas observaciones reafirman la importancia del eje IL-15/IL-15R α en EC y pueden contribuir a mejorar nuestro conocimiento sobre las etapas tempranas de la patología.

Hemos observado que existe además un aumento en la expresión de V α 24, asociado a células iNKT, en duodeno de pacientes celíacos tanto al diagnóstico como en dieta. Este aumento además se correlaciona con la expresión de IFN γ en la mucosa, sugiriendo un rol para estas células en la respuesta temprana a gluten y el mantenimiento de la fase crónica.

Además hemos evidenciado una reducción en los niveles de FoxP3. La falla funcional de las células Tregs ha sido descrita en EC pero los mecanismos no son aún completamente conocidos. Por otro lado, la evaluación de los niveles de RNAm de FoxP3 junto con V α 24 permitió diferenciar la población de pacientes celíacos de la de controles y puede resultar útil en diagnóstico molecular en casos que no pueden resolverse con el protocolo convencional.

Materiales y Métodos.

En este capítulo utilizamos muestras provenientes de cuatro tipos de individuos: pacientes controles no celíacos (C) pacientes controles con inflamación (I), individuos celíacos en actividad (EC activos) e individuos celíacos tratados en dieta libre de gluten (DLG). Al diagnóstico, todos los pacientes celíacos presentaban síntomas compatibles con la enfermedad, como serología positiva (anticuerpos IgA anti-endomisio y/o anti-transglutaminasa 2) y, en aquellos procedentes de España, genética positiva (HLA-DQ2/DQ8). En todos los casos el diagnóstico de EC se corresponde con una alteración histológica característica de EC. Los pacientes en DLG por al menos un año, presentaban una recuperación de la lesión histológica (Marsh 0-1), además de serología negativa. Las muestras biológicas utilizadas fueron explantes de mucosa intestinal obtenidos por biopsia.

Las muestras de biopsia duodenal de pacientes control C y control I se tomaron de pacientes que fueron referidos a las consultas de gastroenterología debido a padecer de otras patologías intestinales no EC tales como gastritis, disfagia, hernia de hiato, etc. En todos los casos, el diagnóstico final fue de no-EC, y en ningún caso presentaron alteraciones de la mucosa al momento de la toma de muestra. En todos los casos se obtuvo consentimiento informado de los pacientes a la toma de muestra.

Los protocolos de estudio fueron aprobados tanto por los Comités de Científico y de Bioética del Instituto de Investigaciones Pediátricas de La Plata, IDIP, Hospital Sor María Ludovica de La Plata; y del Hospital San Martín de La Plata; como por las Comisiones de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. El número detallado de cada tipo de muestra y de cada grupo de paciente estudiado en cada abordaje experimental se detalla como sigue.

Muestras de pacientes estudiadas

En el estudio de distribución tisular de células dendríticas en mucosa de intestino delgado y su relación con mediadores proinflamatorios, se obtuvieron biopsias duodenales de pacientes pediátricos atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Sor María Ludovica de La Plata. Se recolectó material obtenido por biopsia duodenal de 25 pacientes celíacos al diagnóstico (EC: edad media 3.65 años; rango 2-11 años; 36% varones); y 20 pacientes control (C: edad media 4.72; rango 2-13 años, 43% varones). Los estudios de inmunofluorescencia sobre muestras fijadas en paraformaldehído se realizaron a partir de material de biopsia de pacientes pediátricos almacenado en tacos de parafina guardados en un banco de muestras perteneciente al Servicio de Patología del Hospital de Niños Sor María Ludovica. Se seleccionaron 28 pacientes celíacos al diagnóstico (EC: edad media 4 años rango 2-11 años) y 30 pacientes control (C: edad media 4 años rango 2-12).

Para el abordaje del eje IL-15/IL-15R α se estudiaron un total de 42 pacientes con EC (edad media 21,24 años, rango 2-68 años, 30,95% varones), de los cuáles 22 se encontraban en DLG (edad media 34,36 años, rango 7-68 años, 31,82% varones) y 20 se encontraban sin tratar (edad media 6,80 años, rango 2-38 años, 30,00% varones). Como controles, se incluyó un grupo de 24 pacientes sanos no-EC (edad media 53,04 años, rango 16-81, 20,83% varones), ninguno de los cuales presentaba alteración histológica duodenal ni implicaba sospecha de EC (que nunca fue confirmada). Todos los pacientes fueron atendidos en los Servicios de Gastroenterología y Pediatría

del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, y en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Valle del Nalón de Asturias.

En el estudio de células $V\alpha 24^+$ y FoxP3 en enteropatía activa se obtuvieron biopsias duodenales de dos poblaciones independientes, en España (Hospital Clínico Universitario de Valladolid) y Argentina (Hospitales Sor María Ludovica y San Martín, La Plata). La población española incluyó 25 pacientes celíacos al diagnóstico (EC activa: edad media: 28.9 años; rango 5-76 años; 42% varones), 15 pacientes celíacos en DLG (DLG; edad media: 34.2 años; rango 4-71 años; 34% varones), 15 pacientes control no celíacos que presentaron inflamación definida por el estudio de anatomía patológica (I: edad media 42.1 años; rango 15-78 años; 56% varones) y 25 pacientes control sin inflamación que no presentaron ninguna patología gastrointestinal que afectara al duodeno (C; edad media 38.3 años; rango 6-81 años; 30% varones). La población argentina incluyó 20 pacientes celíacos al diagnóstico (EC activa: edad media 24.8 años; rango 4-56 años; 28% varones) y 19 controles sin inflamación (C: edad media 31.4 años; rango 6-62 años; 52% varones).

En el estudio sobre población control separada en grupos en base al nivel de expresión de IL-15R α se obtuvieron biopsias duodenales de 40 pacientes control sin inflamación, obtenidas en los hospitales Clínico Universitario de Valladolid, Hospital Sor Maria Ludovica de La Plata y Hospital San Martín de La Plata. 21 pacientes de población española (C; edad media 38.3 años; rango 6-81 años; 30% varones) y 19 pacientes de población argentina (C: edad media 31.4 años; rango 6-62 años; 52% varones).

Procesamiento de las muestras de biopsia duodenal.

Los explantes procedentes de las biopsias duodenales sufrieron un procesamiento diferencial según el estudio al que iban a ser sometidas. Algunas se embebieron inmediatamente en solución de RNALater® solution (Ambion Inc, Texas, USA) y fueron congeladas hasta su procesamiento. Otras fueron sometidas en fresco a un cultivo de explante completo de biopsia duodenal, transportadas en medio HBSS-Gentamicina (500 μ g/ml Life Technologies-GIBCO) y mantenidas en frío hasta su procesamiento (llevado a cabo en el intervalo máximo de una hora).

Cultivos de Biopsias y ensayos de estimulación

Los cultivos de biopsia duodenales se realizaron con muestras procedentes tanto de pacientes control no-EC, como de EC en DLG y serología negativa por tiempo superior a un año, y sin alteraciones duodenales al momento de la toma de la muestra.

En todos los casos, el cultivo se comenzó en el plazo máximo de una hora tras la obtención de la muestra. Todos los explantes se lavaron en una solución de HBSS-Gentamicina (500 μ g/ml Life Technologies-GIBCO) con el fin de eliminar la mayor parte de las bacterias Gram negativas del duodeno. El medio de cultivo estuvo constituido por RPMI 1640 (Cambrex) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado (Cambrex), L-glutamina (2mM, Cambrex), penicilina (100 U/ml, Life Technologies-GIBCO), estreptomycin (100 μ g/ml, Life Technologies-GIBCO) y fungizona (0.25 μ g/ml, Life Technologies-GIBCO). Cada experimento incluyó el cultivo basal de un explante en medio de cultivo, que constituyó un control interno de cada experimento. Los estímulos se realizaron suplementando el medio de cultivo con la citoquina recombinante humana IL-15 (50ng/ml IL-15, R&D), en el caso de los experimentos correspondientes al estudio del eje IL-15/IL-15R α ; y con

100µg/ml de una solución en etanol 70% de gliadinas (Sigma), en el caso de los experimentos de correlación de la producción de IFN γ con la expresión de células V 24. Todos los cultivos se realizaron por inmersión en placas de cultivo, utilizando un incubador celular a 37°C con 5% CO₂. Tras 3 horas de cultivo, los explantes de biopsias, tanto en cultivo basal como estimulados, fueron lavados en HBSS-Gentamicina (500 µg/ml) y cultivados de nuevo en medio basal otras 21 horas. El objetivo fue realizar las estimulaciones en un contexto lo más fisiológico posible (3 horas), obviando una estimulación más larga que no reflejaría los mecanismos *in vivo*, ya que se estima que el tiempo de tránsito de los antígenos de la dieta a lo largo del duodeno es de 3 horas, aproximadamente. Tras un total de 24 horas de cultivo (3 horas con estímulo + 21 horas basales), el tejido se embebió en solución RNAlater y se congeló inmediatamente hasta el momento de realizar la extracción de RNA y de proteínas.

Reactivos utilizados

Todo el material utilizado fue previamente esterilizado mediante autoclave. De igual forma, todos los reactivos utilizados para los cultivos celulares fueron evaluados para la existencia de LPS contaminante. Sólo se usaron aquellos reactivos por debajo del nivel de detección de un kit de LPS (*Lymulus amoebocyte* lisate, PYROGENT® Plus, Cambrex, límite detección 1µM) para asegurar que los posibles efectos activadores de las condiciones de cultivo fueran realmente debidos a la condición estudiada y no al LPS contaminante.

Análisis Molecular.

La extracción de RNA y de las proteínas totales de los explantes de biopsias (tanto cultivadas como preservadas en RNAlater) se realizó usando Trizol® (Invitrogen–Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el tejido se disgregó en 1ml de Trizol en un homogenizador mecánico, reposando 5 minutos a temperatura ambiente (Tamb.). Después se añadieron 0,2 mL de cloroformo, vórtex por 2-3 minutos, y centrifugación (12.000rpm, t= 15', T= 4°C) tras la que se separaron dos fases: la inferior orgánica que contiene el DNA y las proteínas, y la superior acuosa, con el RNA. El RNA se purificó recogiendo la fase superior, precipitándose con un volumen de isopropanol, seguido de centrifugación (12.000rpm, t= 10', T= 4°C) para descartar el sobrenadante. Sobre el precipitado se añadió 1mL de etanol 75%, vórtex, y centrifugación (7.500rpm, t= 5', T= 4°C) para descartar el sobrenadante. Tras secar el etanol, el RNA se resuspendió en agua libre de RNAasas.

Para purificar las proteínas, se utilizó la fase inferior orgánica (primer sobrenadante retirado durante la purificación). Se precipitaron las proteínas añadiendo 1 volumen de isopropanol, seguido de centrifugación (12.000rpm, t= 10', T= 4°C) para descartar el sobrenadante. Después se añadieron 2mL de etanol 95%-Guanidina HCl 0,3M, y se incubó (t= 20', Tamb), seguido de centrifugación (7.500rpm, t= 5', T= 4°C) por 3 veces. Tras añadir 2 mL de etanol al 100%, se incubó durante 20 minutos a Tamb seguido de centrifugación (7.500rpm, t=5',T=4°C). El precipitado proteico se secó y se resuspendió en SDS 1%. La cuantificación de la concentración proteica se determinó de acuerdo a la reacción de Bradford siguiendo las instrucciones del fabricante (DC Protein assay, Biorad).

PCR cuantitativa

En todos los casos, la cuantificación del RNAm se realizó por PCR de retrotranscripción (RT-PCR) para obtener cDNA y PCR cuantitativa (qPCR) con el fin de evaluar la cantidad parcial de cDNA bajo estudio en el total. Tanto en los RNAs obtenidos tras el cultivo de biopsias, como en los RNAs de biopsias no cultivadas procedentes de nuestra RNateca y mantenidas en RNAlater, la RT-PCR se realizó usando el kit SuperScript® First-Strand Synthesis System for reverse Transcriptase (RT)-PCR Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA) con primers oligo dT. En todos los casos se utilizó una recta de calibración para cada producto construida con diluciones seriadas de cDNA de líneas celulares estimuladas que expresaban la molécula bajo estudio, usándose el gen β -actina como gen *housekeeping* para normalizar las diferentes cantidades de RNA entre las muestras. Para la qPCR a tiempo real se utilizó un LightCycler® instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Las reacciones se realizaron con FastStart SYBR Green MasterMix (Roche) añadiendo Uracil DNA glycosilasasa (UDG) (Roche) para prevenir contaminaciones cruzadas en qPCRs de diferentes muestras. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias del ratio molécula/ β -actina. Todas las moléculas que no presentaron niveles detectables de expresión tuvieron asignado un valor arbitrario de 0.1. Las secuencias de los *primers* usados, así como la longitud en pares de bases del amplificado, tiempo de *annealing* y referencia de los *primers* se especifican en la tabla 1. La especificidad de todos los *primers* usados fue evaluada por partida doble. En primer lugar, antes de encargar los *primers* (MWG biotech, Alemania), se obtuvo la secuencia del cDNA de todas las isoformas descritas de cada molécula desde el Genbank y se alineó con la secuencia de primers seleccionados mediante el software Bioedit (1) para comprobar la especificidad de los *primers*. En todos aquellos casos en los que la molécula en estudio presentaba varias isoformas alternativas, se seleccionaron aquellos *primers* que o bien amplificaban por igual y con el mismo tamaño todas las isoformas (como fue el caso de la molécula FoxP3), o por el contrario únicamente amplificaban aquellas isoformas interesantes para nuestro estudio, como en el caso de IL-15R α dónde únicamente se estudiaron las isoformas no secretadas.

Secundariamente, y una vez hecha la PCR, la especificidad de la amplificación fue estudiada tanto mediante la evaluación de los picos de *melting* como confirmando el tamaño molecular, en pares de bases, de los productos generados.

Tabla 2

Molécula	Secuencia de los <i>primers</i>	bp	T <i>annealing</i>	Referencia
β -actina	fw: 5' - ATG GGT CAG AAG GAT TCC TAT GTG - 3' rv: 5' - CTT CAT GAG GTA GTC AGT CAG GTC-3'	359	60	(A)
IL15R α	fw: 5' - GCC AGC GCC ACC CTC CAC AGT AA - 3' rv: 5' - GCC AGC GGG GGA GTT TGC CTT GAC - 3'	402	70	(B)
IFN γ	fw: 5' - TGG AAA GAG GAG AGT GAC AG - 3' rv: 5' - ATT CAT GTC TTC CTT GAT GG - 3'	129	60	(C)
STAT1	fw: 5' - CCA TCC TTT GGT ACA ACA TGC - 3' rv: 5' - TGC ACA TGG TGG AGT CAG G - 3'	71	56	(D)
IL-23 (p19)	fw: 5' -AGC AGC TCA AGG ATG GCA CTC AG -3' rv: 5' - CCC CAA ATT TCC CTT CCC ATC TA -3'	206	60	(E)
V α 24	fw: 5' - CTG GAG GGA AAG AAC TGC -3' rv: 5' - TGT CAG GGA AAC AGG ACC -3'_	105	65	(F)
FoxP3	fw: 5' - CAG CAC ATT CCC AGA GTT CCT C -3' rv: 5' GCG TGT GAA CCA GTG GTA GAT C -3'	154	60	(G)

IL-21	Sondas TaqMan comerciales de Applied Biosystem Taqman Gene Expression Assay		
IFN γ R	Sondas comerciales UPL®	60	-
IL17A	Sondas comerciales UPL®	60	-

Secuencia de los *primers* usados en los estudios de qPCR, conjuntamente con el tamaño en pares de bases de los amplificadores (bp), T de *annealing* de la PCR y referencia de los *primers* utilizados.

(A) Bongers M, *et al.*, (2003); (B)Tejman-Yarden N, *et al.* (2005); (C) Karlsson MG, Ludvigsson J. 1998); (D) Hough *et al.*, 2001; (E) Wesa A, Galy A. 2002; (F) Grose RH, *et al.*, 2007; (G) Roberts T, *et al.*, 2007.

Western-Blot

La técnica de Western-blot se aplicó para el estudio de la presencia/ausencia de la citoquina IL-15 en los extractos proteicos completos de los explantes de biopsia duodenal. Para su estudio, únicamente se cargaron 8 μ g de proteína total por pocillo, previamente desnaturalizada (T= 95°C, t= 2'). La electroforesis se realizó usando un gel acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) a una concentración del 15%, en un sistema mini-Protean II (Biorad). La electrotransferencia a membrana PVDF (Pierce Biotechnology) fue realizada mediante *blotting* húmedo. Las membranas fueron bloqueadas durante una hora en solución 0.5% BSA en TBE-Tween y posteriormente incubadas toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario específico de ratón anti-IL-15 humana (MAB 247, R&D) a dilución final de 1/400 en solución de bloqueo 0.5% BSA en TBE-Tween. La incubación secundaria se realizó con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (Amersham) y revelado mediante sustrato quimioluminiscente Lumigen PS-3 (Amersham) sobre una placa de autoradiografía Hyperfilm ECL (Amersham). Como control positivo se utilizó IL-15 recombinante humana (Preprotech).

Estudios de inmunofluorescencia

La expresión de CD11c, IL-23, IL17, IL-15, e IL-15R α en cortes histológicos de muestras duodenales fue estudiada mediante microscopía de fluorescencia con análisis confocal. Los explantes duodenales fueron fijados en medio de Browin y embebidos en parafina. Una vez obtenidos los cortes, las secciones desparafinadas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente a la molécula que se deseaba detectar durante una hora, luego se procedió a realizar dos lavados con PBS-Tween 20 0,05% y se incubaron las piezas con el correspondiente conjugado en función de las características del anticuerpo primario. Los análisis de microscopía confocal fueron realizadas en un microscopio LSM 510 meta Zeiss usando el software LSA 5 v 3.2.

Anticuerpos utilizados:

- Goat anti-IL-15R α , R&D (dilución de trabajo 50 μ g/ml)
- Goat anti-IL-17, R&D, clone #AF-3/7-NA, 100 μ g. Dilución de trabajo 150 μ g/ml.
- Rabbit monoclonal (IgG) [EP1347Y] (ab52632) anti-hu-CD11c Abcam. Dilución de trabajo 1/150.
- Mouse anti-IL-15 R&D, clone 34593, cat: MAB247, lot: SA014031. Dilución de trabajo 1/150.
- Mouse anti-IL-23p19 Biolegend clone HLT2736. Dilución de trabajo 150 μ g/ml.
- Donkey anti-goat Cy5 Jackson ImmunoResearch Laboratories, code 705-175-147. Dilución de trabajo 1:200.

- Goat a-mouse IgG-FITC, Santa Cruz, SC2010, human adsorbed, Santa Cruz Biotechnology. Dilución de trabajo 1:200.
- Monoclonal Anti-Rabbit IgG (γ -chain specific)-FITC antibody produced in mouse clone RG-96 SIGMA / anti-Rabbit IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in goat. F9887 SIGMA.

Cuantificación de $IFN\gamma$ en los sobrenadantes de cultivo

Los sobrenadantes finales (tras 3 horas de cultivo con estímulo y otras 21 horas en medio basal) se estudiaron en un ensayo multiplex (Bio-Rad, Hercules, Calif) utilizando una plataforma Luminex (Austin, Tex). Las placas con filtro se prehumedecieron, añadiéndose luego las micropartículas marcadas con fluorocromos específicos para cada citoquina. Tras lavar 2 veces la placa, se añadieron tanto los estándares suministrados con el kit como las muestras de estudio, en este caso los sobrenadantes de incubación de las biopsias, y se incubaron en agitación durante 30'. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces, y se añadieron anticuerpos secundarios, incubándose en la placa durante 30' en agitación. Los anticuerpos se retiraron mediante 3 lavados, tras los que se añadió estreptavidina conjugada con PE, con incubación durante otros 10' en agitación. Finalmente, se realizaron 3 lavados antes de resuspender las micropartículas y leer la placa en una plataforma Luminex, extrapolar los resultados de intensidad de fluorescencia a las concentraciones de la curva suministrada por el kit. Los límites de detección para cada citoquina se calcularon considerando 2 veces la desviación estándar obtenida sumada al blanco, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Las citoquinas determinadas, y sus niveles de detección (L.D.) fueron: interferón γ ($IFN\gamma$) (L.D. 0,542pg/ml), factor de necrosis tumoral α ($TNF\alpha$) (L.D. 0,356pg/ml), interleuquina (IL)-12p70 (L.D. 0,927pg/ml) e IL-2 (L.D. 4,422pg/ml). Para nuestros estudios en particular utilizamos sólo los resultados obtenidos para interferón γ . Los valores por debajo de los niveles de detección fueron asignados como iguales a dicho valor.

Análisis estadístico

Se aplicó una estadística no paramétrica para la evaluación de los niveles de RNAm, o expresión proteica entre grupos, mediante los tests Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Cuando se compararon diferentes condiciones de cultivo del mismo paciente se aplicó una estadística pareada no paramétrica mediante el test Wilcoxon pareado. El nivel de significación fue fijado en $p < 0,05$. En los estudios de correlación se utilizó la correlación de Spearman.

Perspectivas de trabajo y conclusiones generales.

Perspectivas de trabajo y conclusiones generales.

Como consecuencia de los estudios realizados desde fines de la década del '80, se ha establecido la participación de los linfocitos T, el rol de las moléculas de HLA, la modificación de antígenos nativos para la formación de neoepitopes mediante la enzima TG2, y más recientemente el hallazgo de un conjunto de genes que contribuyen a la patogenia de EC. Sin embargo, etapas críticas del inicio de la patología y la comprensión de sus tan variables formas de presentación y asociación a patologías autoinmunes aún no han sido dilucidadas.

Por otro lado, es de destacar que el estudio de EC ha brindado además información relevante sobre aspectos de la biología del sistema inmune de mucosa de intestino delgado, a pesar de que la fuente primaria para experimentación ha sido solo el estudio de pequeñas piezas de tejido duodenal. Al presente, no se dispone de modelos animales que reproduzcan las características del daño de EC.

El presente trabajo presenta un enfoque innovador sobre algunos aspectos de la patogenia de EC. En particular, hemos puesto en evidencia que existe una condición de estrés en el tejido que, estudiada a través de la expresión de MICA/B, nos revela que estos mecanismos son parte del fenómeno de daño y que podrían contribuir a la cronicidad de la lesión, como una fuente permanente de generación de señales inflamatorias.

Varios aspectos relacionan a EC con una patología autoinmune como lo es su fuerte asociación con alelos del HLA, y la presencia de autoanticuerpos. Sin embargo, los alelos de susceptibilidad presentan solo péptidos derivados de proteínas exógenas, gliadinas y gluteninas, o en general péptidos derivados de gluten. No hay ninguna descripción de péptidos propios involucrados en la respuesta inmune y tampoco hay evidencia de que participen linfocitos T Th1 autoreactivos. Este es un aspecto esencial de la patología ya que si bien se ha propuesto que los principales mecanismos de daño son citotóxicos no es claro cuál es el blanco de las células citotóxicas.

En EC es aceptado que los péptidos derivados del gluten actuarían como un factor disparador que magnifica y mantiene los mecanismos de daño, sin embargo para el desarrollo de EC actuarían otros factores desencadenantes siendo la disbiosis o alteración de la microbiota y las infecciones virales, junto con ciertos péptidos derivados de gliadinas, como el p31-43, buenos candidatos para este rol. Entonces, tanto los factores desencadenantes como los que expanden los mecanismos de la lesión actuarían en un entorno genético particular necesario sin el cual la patología nunca llegaría a desencadenarse.

En este sentido, hemos explorado la participación de señales inflamatorias generadas en los ejes IL-15 e IL-23/IL-17/IL-21 a las que, si bien se les ha atribuido diferentes funciones, ha sido difícil estudiarlas en intestino delgado humano. Nuestros resultados muestran un menor umbral de respuesta a IL-15, debido a la sobreexpresión de su receptor. El eje IL-15/IL-15R α está activo también en un grupo de individuos de población control no celíacos, lo que conduce nuevamente a la consideración de diversos factores que deben contribuir para el desencadenamiento de EC.

Este estudio logra ampliar, además, el conocimiento sobre el rol de MICA en el desarrollo de la enteropatía. Si bien no contradecemos el modelo inicial en el cual, su expresión en los enterocitos permite la activación de los linfocitos intraepiteliales mediante el receptor NKG2D, nuestros resultados sugieren que la expresión de MICA ejerce función también en otras poblaciones celulares. En este sentido, observamos expresión de MICA en mucosa duodenal de pacientes con EC en linfocitos

intraepiteliales; en linfocitos T, linfocitos B y células plasmáticas de *lamina propria*. Dada la asociación de MICA y estrés celular, proponemos que MICA podría participar en mecanismos más amplios de control de poblaciones celulares. Los diversos patrones de expresión observados en los diferentes tipos celulares, en conjunción con los estudios realizados sobre modelos de estrés celular *in vitro*, utilizando células de líneas epitelial, linfocítica y monocítica, demuestran que, esta proteína sensible a estrés, logra sobreexpresarse y/o relocalizarse en diferentes estructuras según el tipo celular y el estresor utilizado. Además, la distribución de MICA observada *in vivo* en algunos de los modelos utilizados *in vitro* sugiere que el patrón de expresión de MICA en la mucosa duodenal en EC es la consecuencia de una situación de estrés crónico. La distribución granular observada, aunque no colocaliza con los gránulos de estrés, no descarta otras estructuras de estrés no estudiadas ni otras organelas sensibles a la respuesta de estrés como lo es el retículo endoplásmico.

Estos resultados abren las puertas a muchos interrogantes relativos al desarrollo de una respuesta de estrés en las células de la mucosa duodenal en EC activa. Para abordar este tema es necesario estudiar la expresión de diversos marcadores de vías de estrés celular en conjunto con marcadores de vías de muerte celular como, por ejemplo algunos de los descritos en el capítulo 2. Dentro de los genes y proteínas candidatos podemos citar en particular, la utilidad de estudiar la relación entre las expresiones de BAX y Bcl-2 como una medida de la relación entre mecanismos anti y pro-apoptóticos. También la relación de la expresión de proteínas como BIP y CHOP, pertenecientes a la respuesta a proteínas mal plegadas nos aportaría luz a cerca del balance entre los mecanismos de supervivencia y pro-apoptóticos puestos en juego. Además podríamos estudiar otras vías de muerte celular como necroptosis y piroptosis, aún poco evaluadas en la mucosa intestinal.

Con respecto al estudio del eje IL-23/Th17, nuestros resultados apoyan la idea de que esta vía está involucrada en la enteropatía y si bien podría ser responsable de las etapas más tempranas de la respuesta a gluten permitiendo, por ejemplo, la infiltración de granulocitos; cuestión no evidenciable en biopsias con daño de larga evolución; nuestros resultados muestran que está activa en la lesión crónica mostrando una distribución diferente de las células tanto IL-23⁺ como Th17⁺ en pacientes con EC, asociado a una mayor expresión de IL-17 e IL-21. En conjunto, podemos inferir que diferentes mediadores se activarían para permitir el reclutamiento diferencial de estas células.

Además, como se comentó, describimos un menor umbral de respuesta a IL-15 en mucosa duodenal en EC activa independiente de la ingesta de gluten, y logramos explicar de qué manera IL-15 puede prolongar su actividad al ser retenida por IL-15R α en la superficie celular, induciendo mecanismos directos de daño en la mucosa.

A pesar de la información disponible, no es posible aun definir las causas que determinan las formas de presentación de EC y las patologías asociadas. En la actualidad, se considera determinante que ciertos genes de contribución menor podrían definir subpoblaciones de individuos celíacos con comportamiento diferencial. El estudio poblacional de múltiples genes agrupados es muy complejo, pero una evidencia indirecta de esto es que, al menos, es posible distinguir grupos de pacientes con mayores niveles de IL-15 o de IFNs tipo I. Es posible que en un futuro estos estudios puedan realizarse ya que permitirían explicar aspectos centrales del desencadenamiento de la patología.

Estas observaciones tienen a su vez implicancias en la interpretación de la asociación EC con otras patologías. Como hemos comentado, existe un grupo de patologías autoinmunes, entre las que destacamos: Tiroiditis autoinmune, Diabetes Mellitus Tipo I y Artritis Reumatoidea, con un alto nivel de asociación a EC. Se propone que estas patologías serían consecuencia de la activación de mecanismos inflamatorios en intestino en EC, que inducirían respuestas autoreactivas en sitios extraintestinales. En un trabajo en colaboración hemos observado en un modelo experimental en ratón, que la respuesta generada frente a la administración de gliadinas en un entorno genético adecuado desencadena insulinitis (Galipeau H. et al., 2011). Es así, que se considera que la respuesta inflamatoria con una exacerbada producción de IFNs tipo I, IL-15, IL-23, IFN γ , entre otros mediadores presentes en la mucosa intestinal en EC activa determina la inducción de autoreactividad en sitios distantes.

También mostramos que otras poblaciones celulares no muy estudiadas en el contexto de esta enteropatía están involucradas en el mecanismo de daño y remodelación de la mucosa con EC. Las células iNKT parecen jugar un rol importante siendo un nexo entre las respuestas innatas y adaptativa. Mostramos que la producción de IFN γ correlaciona con el nivel de células iNKT en respuesta a estimulación con gliadinas en pacientes celíacos con mucosas normalizadas por la dieta libre de gluten. Además, mostramos que las medidas de expresión de V α 24 y FoxP3 en conjunto en mucosa duodenal pueden utilizarse como herramienta diagnóstica en casos dudosos o que generen controversia.

Si bien mucho se ha definido en el estudio de mediadores moleculares de daño en EC, resta camino por recorrer para contestar interrogantes básicos, como cuáles son los factores desencadenantes de EC, las fuentes de producción principales de ciertos mediadores, cuales son los mecanismos efectores generados, cuales son las vías de muerte celular y los mecanismos de remodelamiento del tejido. Esta información es importante para el conocimiento de los mecanismos implicados en la patogenia de EC y sus diferencias con sensibilidad al gluten no celíaca, y también para el diseño de estrategias terapéuticas de inmunomodulación tendientes a mejorar la calidad de vida de los pacientes celíacos y modificar el curso de la aparición de enfermedades asociadas.

Referencias.

- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:493-525.
- Adams F. *The Extant Works of Aretaeus, The Cappadocian.* By Aretaeus Edited by: Francis Adams LL.D. (trans.) Boston Milford House Inc. 1972
- Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell.* 2007. 27, 53–66.
- Acosta-Rodriguez, EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature Immunol.* 2007. 8, 639–646.
- Aggarwal S, Lebowitz B, Green PH. Screening for celiac disease in average-risk and high-risk populations. *Therap Adv Gastroenterol.* 2012 Jan;5(1):37-47. doi: 10.1177/1756283X11417038.
- Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggener M. Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem.* 2001 Nov;47(11):2023-8.
- Allegretti Y., Cueto Rua E., Drut R., Fuertes M., Zwirner N. and Chirido F.G. "MICA expression in normal and coeliac intestinal mucosa". Proceedings of the 20th Meeting of the European Working Group on prolamins analysis and toxicity. Maikammer, Germany. 2005. Pag 99-106, ISBN: 3-937524-39-8.
- Allegretti Y., Guzman L., Cueto Rua E., Drut R., Zwirner N. and Chirido F. G. "Expression of MICA in the small bowel mucosa". Proceedings of the 21st Meeting of the European Working Group on prolamins analysis and toxicity. Trieste, Italia. 2006. Pag 83-88, ISBN: 978-3-9377524-54-2.
- Allegretti YL, Bondar C, Guzman L, Cueto Rua E, Chopita N, Fuertes M, Zwirner NW, Chirido FG. Broad MICA/B expression in the small bowel mucosa: a link between cellular stress and celiac disease. *PLoS One.* 2013. Sep 13;8(9):e73658. doi: 10.1371/journal.pone.0073658. eCollection 2013.
- Amarri S, Alvisi P, De Giorgio R, Gelli MC, Cicola R, Tovoli F, Sassatelli R, Caio G, Volta U. Antibodies to deamidated gliadin peptides: an accurate predictor of coeliac disease in infancy. *J Clin Immunol.* 2013. 33:1027–1030.
- American Gastroenterological Association medical position statement: celiac sprue. *Gastroenterology* 2001. 120:1522-5
- Antón, L.C. Schubert U, Bacík I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rechsteiner MC, Bennink JR, Yewdell JW. Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell Biol.* 1999. 146, 113–124.
- Arranz E, Telleria JJ, Sanz A, Martín JF, Alonso M, Calvo C, Blanco-Quirós A. HLA-DQA1*0501 and DQB1*02 homozygosity and disease susceptibility in Spanish coeliac patients. *Exp Clin Immunogenet.* 1997;14(4):286-90.
- Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):411-20. doi: 10.1038/nri2316.
- Bailey, C.H. una traducción de la lectura de Beccari "Concerning Grain" (1728). *Cereal Chem.* 1941. 18:555-561.
- Ballard DW. Molecular mechanisms in lymphocyte activation and growth. *Immunol Res.* 2001;23(2-3):157-66.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature,* 1998. 392:245–252. 10.1038/32588

- Barone MV, Gimigliano A, Castoria G, Paoella G, Maurano F, Paparo F, Maglio M, Mineo A, Miele E, Nanayakkara M, Troncone R, Auricchio S. Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut*. 2007 Apr;56(4):480-8. Epub 2006 Aug 4.
- Barone MV, Zanzi D, Maglio M, Nanayakkara M, Santagata S, Lania G, Miele E, Ribecco MTS, Maurano F, Auricchio R, Gianfrani C, Ferrini S, Troncone R, Auricchio S. Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *Plos One* 2011. 6, e17039. doi:10.1371/journal.pone.0017039.
- Bayardo M, Punzi F, Bondar C, Chopita N, Chirido F. Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- γ and tumour necrosis factor- α in human small intestine. *Clin Exp Immunol*. 2012 Apr; 168(1):95-104. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04545.x.
- Beach 1961, Beccari 1745: una traducción inglesa del original en italiano fue publicado por Bailey 194.
- Beitnes AC, Ráki M, Lundin KE, Jahnsen J, Sollid LM, Jahnsen FL. Density of CD163+ CD11c+ dendritic cells increases and CD103+ dendritic cells decreases in the coeliac lesion. *Scand J Immunol*. 2011 Aug;74(2):186-94. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02549.x.
- Beitnes AC, Ráki M, Brottveit M, Lundin KE, Jahnsen FL, Sollid LM. Rapid accumulation of CD14+CD11c+ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge. *PLoS One*. 2012;7(3):e33556.
- Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ, Verkarre V, Allez M, Cellier C, Hermine O, Cerf-Bensussan N. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007 Mar;132(3):994-1008.
- Benahmed M, Belhadj Hmida N, Moes N, Buyse S, Abdeladhim M, et al. IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Immunol*. 2009.182:6763-70
- Bergseng E, Xia J, Kim CY, Khosla C, Sollid LM. Main chain hydrogen bond interactions in the binding of proline-rich gluten peptides to the celiac disease-associated HLA-DQ2 molecule. *J Biol Chem*. 2005 Jun 10;280(23):21791-6.
- Bernardo D, Garrote JA, Fernández-Salazar L, Riestra S, Arranz E et al. Is gliadin really safe for non-celiac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-celiac individuals challenged with gliadin peptides. 2007. *Gut*. Jun;56(6):889-90
- Bernardo D, Garrote JA, Allegretti Y, León A, Gómez E, Bermejo-Martin JF, Calvo C, Riestra S, Fernández-Salazar L, Blanco-Quirós A, Chirido F, Arranz E. Higher constitutive IL15R alpha expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2008 Oct;154(1):64-73. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03743.x.
- Bernardo D, Al-Hassi HO, Mann ER, Tee CT, Muruganathan AU, Peake ST, et al. T-cell proliferation and forkhead box P3 expression in human T cells are dependent on T-cell density: physics of a confined space? *Hum Immunol*. 2012. 73(3):223-31.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. 2000. *Nature Cell Biol*. 2, 326–332.
- Bertolotti, A. Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, West AB, Ron D. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *J. Clin. Invest*. 2001. 107, 585–593.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8. Epub 2006 Apr 30.

- Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Ferguson A, Godkin A, Hogberg L, Holmes G, Hosie KB, Howdle PD, Jenkins H, Jewell D, Johnston S, Kennedy NP, Kerr G, Kumar P, Logan RF, Love AH, Marsh M, Mulder CJ, Sjoberg K, Stenhammer L, Walker-Smith J, Marossy AM, Houlston RS. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet.* 1999 Sep;36(9):687-90.
- Bevins CL. Innate immune functions of α -defensins in the small intestine. *Dig Dis.* 2013;31(3-4):299-304. doi: 10.1159/000354681.
- Bister V, Kolho KL, Karikoski R, Westerholm-Ormio M, Savilahti E, Saarialho-Kere U. Metalloelastase (MMP-12) is upregulated in the gut of pediatric patients with potential celiac disease and in type 1 diabetes. *Scand J Gastroenterol.* 2005. Dec;40(12):1413-22.
- Bjorck S, Brundin C, Lorinc E, Lynch KF, Agardh D. Screening detects a high proportion of celiac disease in young HLA-genotyped children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2010. 50:49–53
- Black KE, Murray JA, David CS. HLA-DQ determines the response to exogenous wheat proteins: a model of gluten sensitivity in transgenic knockout mice. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5595-600.
- Bläss S, Union A, Raymackers J, Schumann F, Ungethüm U, Müller-Steinbach S, De Keyser F, Engel JM, Burmester GR. The stress protein BiP is overexpressed and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001 Apr;44(4):761-71.
- Bodd M, Ráki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE, Sollid LM. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunol.* 2010 Nov;3(6):594-601. doi: 10.1038/mi.2010.36.
- Bodd M, Kim CY, Lundin KE, Sollid LM. T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology.* 2012 Mar;142(3):552-61. doi: 10.1053/j.gastro.2011.11.021.
- Bondar C, Araya RE, Guzman L, Rua EC, Chopita N, Chirido FG. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PLoS One.* 2014 Feb 20;9(2):e89068. doi: 10.1371/journal.pone.0089068.
- Bondar C, Plaza-Izurieta L, Fernandez-Jimenez N, Irastorza I, Withoff S, Wijmenga C, Chirido F, Bilbao JR; CEGEC. THEMIS and PTPRK in celiac intestinal mucosa: coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge. *Eur J Hum Genet.* 2014 Mar;22(3):358-62. doi: 10.1038/ejhg.2013.136.
- Bongers M, Liehl E, Barsig J. One-step RT-PCR to detect cytokine/chemokine induction in macrophages. *Focus* 2003; 21:66–8.
- Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C, Troncone R, Spampinato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L. HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut.* 2007 Aug;56(8):1054-9.
- Bourlière M, Oulés V, Perrier H, Mengotti C. Onset of coeliac disease and interferon treatment. *Lancet.* 2001 Mar 10;357(9258):803-4.
- Bracken Suzanne, Byrne Greg, Kelly Jacinta, Jackson John and Feighery Conleth. Altered gene expression in highly purified enterocytes from patients with active coeliac disease. *BMC Genomics* 2008, 9:377 doi:10.1186/1471-2164-9-377.
- Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, et al. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol.* 2011. 12(12):1202-11.
- Brown CR, Doxsey SJ, White E, Welch WJ. Both viral (adenovirus E1B) and cellular (hsp 70, p53) components interact with centrosomes. *J. Cell. Physiol.*1994. 160, 47–60.

- Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell*. 2009 Dec 25;36(6):932-41. doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.020.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002;415, 92–96.
- Calleja S, Vivas S, Santiuste M, Arias L, Hernando M, Nistal E, et al. Dynamics of non-conventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and gammadelta T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology. *Dig Dis Sci*. 2011. 56(7):2042-9.
- Cammarota G, Cuoco L, Cianci R, Pandolfi F, Gasbarrini G. Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet*. 2000. 356:1494–95
- Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B, Venuta S. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*. 2005. Jan 1;105(1):251-8.
- Cataldo F, Montalto G. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol*. 2007 Apr 21;13(15):2153-9)
- Catassi C, Räscht IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL. Antigliadin antibody screening for coeliac disease. *Acta Paediatr*. 1994. Mar;83(3):349-50.
- Catassi C. [To screen or not to screen? The case of celiac disease]. *Recenti Prog Med*. 1996. Nov; 87 (11):519-22. Italian.
- Catassi C, Fabiani E, Räscht IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, Alessandrini S, Iwanejko G, Domenici R, Mei E, Miano A, Marani M, Bottaro G, Spina M, Dotti M, Montanelli A, Barbato M, Viola F, Lazzari R, Vallini M, Guariso G, Plebani M, Cataldo F, Traverso G, Ventura A, et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl*. 1996. May;412:29-35.
- Catassi C, Räscht IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, Frijia M, Bearzi I, Vizzoni L. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):647-8
- Catassi C. The world map of celiac disease. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2005. 35(1):37-55.
- Catassi C and Cobellis G. Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world *Dig Liver Dis*. 2007 Oct;39(10):908-10.
- Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2007 Jan;85(1):160-6.
- Caputo I, Secondo A, Lepretti M, Paoletta G, Auricchio S, Barone MV, Esposito C. Gliadin peptides induce tissue transglutaminase activation and ER-stress through Ca²⁺ Mobilization in Caco-2 cells. *Plos One*. 2012. 7, e45209. doi:101371/journal.pone.0045209
- Castillo NE, Theethira TG, Leffler DA. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2015 Feb;3(1):3-11. doi: 10.1093/gastro/gou065.
- Cella *et al.*, 1997 Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):782-7.

- Cellier C, Patey N, Mauvieux L, Jabri B, Delabesse E, Cervoni JP, Burtin ML, Guy-Grand D, Bouhnik Y, Modigliani R, Barbier JP, Macintyre E, Brousse N, Cerf-Bensussan N. Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. *Gastroenterology*. 1998 Mar;114(3):471-81.
- Chieppa M., Rescigno M., Huang A. Y., Germain R. N. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.* 2006. 203, 2841–2852.
- Cinova J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, et al. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol*. 2007. Mar;27(2):201-9.
- Chackerian AA, Chen SJ, Brodie SJ, Mattson JD, McClanahan TK, Kastelein RA, Bowman EP. Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. *Infect Immun*. 2006 Nov;74(11):6092-9.
- Chen, X., Shen, J. & Prywes, R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* 2002. 277, 13045–13052.
- Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1317-26.
- Chen GY, Chen C, Wang L, Chang X, Zheng P, Liu Y. Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol*. 2008. 180(8):5163-6.
- Cheroutre H, Lambomez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2011. 11:445–456
- Chinen T, Volchkov PY, Chervonsky AV, Rudensky AY: A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota. *J Exp Med*. 2010, 207:2323-2330.
- Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):576-87. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.007.
- Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. 2003. Feb;52(2):218-23.
- Clevers HC, Bevins CL. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:289-311. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183744.
- Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunol*. 2011 Jun;12(6):560-7. doi: 10.1038/ni.2027.
- Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J. Clin. Pathol*. 2009. 62, 264–269.
- Colpitts SL, Stoklasek TA, Plumlee CR, Obar JJ, Guo C, Lefrançois L. Cutting edge: the role of IFN- α receptor and MyD88 signaling in induction of IL-15 expression in vivo. *J Immunol*. 2012 Mar 15;188(6):2483-7. doi: 10.4049/jimmunol.1103609.
- Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, et. al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces FoxP3+ regulatory T cells via a TGF β and retinoic acid dependent mechanism. *J Exp. Med*. 2007. 204:1757-64

- Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 12;105(32):11287-92. doi: 10.1073/pnas.0801631105.
- Corrigall VM, Bodman-Smith MD, Fife MS, Canas B, Myers LK, Wooley P, Soh C, Staines NA, Pappin DJ, Berlo SE, van Eden W, van Der Zee R, Lanchbury JS, Panayi GS. The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis. *J. Immunol*. 2001 166,1492–1498.
- Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot JP, Ginies JL, Dabadie A, Mouterde O, Allez M, Nion-Lamurier I; Groupe D'Etude et de Recherche Sur la Maladie Coeliaque. Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jul;6(7):753-8. doi: 10.1016/j.cgh.2007.12.022.
- Cox, J. S. & Walter, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 1996. 87, 391–404.
- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M. & Walter, P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005. 102, 18773–18784.
- Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Rev. Immunol*. 2010. 10, 479–489.
- Dafik L, Albertelli M, Stamnaes J, Sollid LM, Khosla C. Activation and inhibition of transglutaminase 2 in mice. *PLoS One*. 2012, 7(2):e30642. doi: 10.1371/journal.pone.0030642.
- Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ, Mear JP, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Colbert RA. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23459-68.
- Daniels I, Cavill D, Murray IA, Long RG. Elevated expression of iNOS mRNA and protein in coeliac disease. *Clin Chim Acta*. 2005. 356(1-2):134-42.
- De Kauwe AL, Chen Z, Anderson RP, Keech CL, Price JD, Wijburg O, Jackson DC, Ladhams J, Allison J, McCluskey J. Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4+ T cells. *J Immunol*. 2009 Jun 15;182(12):7440-50. doi: 10.4049 / jimmunol. 0900233.
- De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol*. 2010 Feb 24;10:63. doi: 10.1186/1471-2180-10-63.
- DePaolo RW, Abadie V, Tang F, Fehlner-Peach H, Hall JA, Wang W, Marietta EV, Kasarda DD, Waldmann TA, Murray JA, Semrad C, Kupfer SS, Belkaid Y, Guandalini S, Jabri B. Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature Mar* 2011, 10;471(7337):220-4. doi:10.1038/nature09849.
- De Stefano D, Maiuri MC, Iovine B, Ialenti A, Bevilacqua MA, Carnuccio R. The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Jan;84(1):65-74.
- Devallière J, Charreau B. The adaptor Lnk (SH2B3): an emerging regulator in vascular cells and a link between immune and inflammatory signaling. *Biochem Pharmacol*. 2011 Nov 15;82(10):1391-402. doi: 10.1016/j.bcp.2011.06.023.

- Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, Gagliardi F, Laghi L, Crecchio C, Guerzoni ME, Gobetti M, Francavilla R. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol.* 2011 Oct 4;11:219. doi: 10.1186/1471-2180-11-219.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):797-801.
- Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology.* 1998. 115:1317–21.
- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* 2006. 55:469–477.
- Di Sabatino A, Pickard KM, Gordon JN, Salvati V, Mazzarella G, Beattie RM, Vossenkaemper A, Rovedatti L, Leakey NA, Croft NM, Troncone R, Corazza GR, Stagg AJ, Monteleone G, MacDonald TT. Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. *Gastroenterology.* 2007 Oct;133(4):1175-87.
- Dolfini E, Elli L, Roncoroni L, et al. Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model. *World J Gastroenterol.* 2005 Oct 14;11(38):5973-7.
- Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2006. Apr;41(4):408-19.
- Drut R, Rúa EC. The histopathology of pediatric celiac disease: order must prevail out of chaos. *Int J Surg Pathol.* 2001 Oct;9(4):261-4.
- Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, Zhernakova A, Heap GA, Adány R, Aromaa A, Bardella MT, van den Berg LH, Bockett NA, de la Concha EG, Dema B, Fehrmann RS, Fernández-Arquero M, Fiala S, Grandone E, Green PM, Groen HJ, Gwilliam R, Houwen RH, Hunt SE, Kaukinen K, Kelleher D, Korponay-Szabo I, Kurppa K, MacMathuna P, Mäki M, Mazzilli MC, McCann OT, Mearin ML, Mein CA, Mirza MM, Mistry V, Mora B, Morley KI, Mulder CJ, Murray JA, Núñez C, Oosterom E, Ophoff RA, Polanco I, Peltonen L, Platteel M, Rybak A, Salomaa V, Schweizer JJ, Sperandeo MP, Tack GJ, Turner G, Veldink JH, Verbeek WH, Weersma RK, Wolters VM, Urcelay E, Cukrowska B, Greco L, Neuhausen SL, McManus R, Barisani D, Deloukas P, Barrett JC, Saavalainen P, Wijmenga C, van Heel DA. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet.* 2010 Apr;42(4):295-302. doi: 10.1038/ng.543.
- Du Pré MF, Samsom JN. Adaptive T-cell responses regulating oral tolerance to protein antigen. *Allergy.* 2011 Apr;66(4):478-90. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02519.x.
- Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun HW, Kanno Y, Powrie F, O'Shea JJ. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* 2010 May 28;32(5):605-15. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.003.
- Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:737–44.
- Eagle RA, Flack G, Warford A, Martínez-Borra J, Jafferji I, et al. Cellular Expression, Trafficking, and Function of Two Isoforms of Human ULBP5 / RAET1G. *PLoS ONE.* 2009. 4(2): e4503. doi:10.1371/journal.pone.0004503
- Ebert EC. IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN γ and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunology* 2005;115:118–126.
- EI-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):568-75. doi: 10.1038/ni.2031.

- Elfström P, Granath F, Ekström Smedby K, Montgomery SM, Askling J, Ekblom A, Ludvigsson JF. Risk of lymphoproliferative malignancy in relation to small intestinal histopathology among patients with celiac disease. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Mar 2;103(5):436-44. doi: 10.1093/jnci/djq564.
- Elliott David E., Siddique Sana S., Weinstock Joel V. Innate Immunity in Disease *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014 May; 12(5): 749–755. Published online 2014 March 12. doi: 10.1016/j.cgh.2014.03.007
- Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, O'Connor W Jr, Rongvaux A, Van Rooijen N, Haberman AM, Iwakura Y, Kuchroo VK, Kolls JK, Bluestone JA, Herold KC, Flavell RA. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature.* 2011 Jul 17;475(7357):514-8. doi: 10.1038/nature10228.
- Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, DeMartino GN. Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J Biol Chem.* 2000 Jan 7;275(1):409-13.
- Fallang LE, Bergseng E, Hotta K, Berg-Larsen A, Kim CY, Sollid LM. Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nat Immunol.* 2009 Oct;10(10):1096-101. doi: 10.1038/ni.1780.
- Farache J, Zigmund E, Shakhar G, Jung S. Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol Cell Biol.* 2013 Mar;91(3):232-9. doi: 10.1038/icb.2012.79.
- Fasano A, Catassi C. Clinical practice. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2012;367:2419–2426
- Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood.* 2001; 97,14–32.
- Fehniger, T. A., M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, and M. A. Caligiuri. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003. 101:3052.
- Ferguson A, Mac Donald TT, McClure JP, Holden RJ. Cell mediated immunity to gliadin within the small intestinal mucosa in coeliac disease. *Lancet.* 1975. 1:895-97
- Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut.* 1993 Feb;34(2):150-1.
- Ferlazzo, G., D. Thomas, S. L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W. A. Muller, A. Moretta, and C. Munz. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* 2004. 172:1455.
- Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. *Nutrients.* 2012. 4(4):243-57.
- Fina, D., M. Sarra, R. Caruso, G. Del Vecchio Blanco, F. Pallone, T. T. MacDonald, and G. Monteleone. Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut.* 2008. 57: 887–892.
- Fink, A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Design.* 1998. 3, R9–R23.
- Forsberg G, Fahlgren A, Hörstedt P, Hammarström S, Hernell O, Hammarström ML. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2004 May;99(5):894-904.

- Fritz JH, Le Bourhis L, Magalhaes JG, et al. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends Immunol.* 2008;29:41–9.
- Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, Barrio MM, Mordoh J, Rabinovich GA, Zwirner NW. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4606-14.
- Galipeau HJ, Rulli NE, Jury J, Huang X, Araya R, Murray JA, David CS, Chirido FG, McCoy KD, Verdu EF. Sensitization to gliadin induces moderate enteropathy and insulinitis in nonobese diabetic-DQ8 mice. *J Immunol.* 2011 Oct 15;187(8):4338-46. doi: 10.4049/jimmunol.1100854.
- García-Mata R, Bebök Z, Sorscher EJ, Sztul ES. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. 1999. *J Cell Biol.* 1999 Sep 20;146(6):1239-54.
- Gass JN, Gifford NM, Brewer JW. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):49047-54.
- Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature.* 2005; 436:1186–90.
- Gee S. On the coeliac disease. *St Bart Hosp Rep.* 1888;24:17–20.
- George EK, Mearin ML, Bouquet J, von Blomberg BM, Stapel SO, et al. High frequency of celiac disease in Down syndrome. *J. Pediatr.* 1996. 128:555–57.
- Gerdes AM, Horder M, Bonnevie-Nielsen V. Increased IFN- α -induced sensitivity but reduced reactivity of 2',5'-oligoadenylate synthetase (2,5AS) in trisomy 21 blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol* 1993 Jul;93(1):93-6.
- Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol.* 2006. Sep 15;177(6):4178-86.
- Gil-Humanes J, Piston F, Shewry PR, Tosi P, Barro F, Suppression of gliadins results in altered protein body morphology in wheat. *J Exp. Bot.* 2011; 62(12): 4203-13.
- Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol.* 2005. 79(7):4470-8.
- Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell.* 2004 Dec;15(12):5383-98.
- Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, et al. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 2007;204:3133–46.
- Giovannini C., Mancini E., De Vincenzi M. Inhibition of the cellular metabolism of Caco-2 cells by prolamin peptides from cereals toxic for celiacs. *Toxicology in Vitro.* 1996. 10 (1996) 533-538.
- Giovannini C., Lechetti R., De Vincenzi M. The activities of peptides "31-43", "44-55" and "56-68" of A-gliadin on in vitro cultures of CaCo-2 cells. *ATLA.* 1997. 25, 437-443.
- Giovannini C, Sanchez M, Straface E, et al Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology.* 2000. Apr 7;145(1):63-71.
- Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, et al. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett.* 2003. Apr 10;540(1-3):117-24.

- Godfrey DI, Pellicci DG, Smyth MJ. Immunology. The elusive NKT cell antigen--is the search over? *Science*. 2004 Dec 3;306(5702):1687-9.
- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):231-7.
- Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S, Castelletto R, Echeverría R, Sugai E, Vazquez H, Mauriño E, Bai JC. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol*. 2001 Sep;96(9):2700-4.
- Gomez JC, Selvaggio G, Pizarro B, Viola MJ, La Motta G, Smecuol E, Castelletto R, Echeverria R, Vazquez H, Mazure R, Crivelli A, Sugai E, Mauriño E, Bai JC. Value of a screening algorithm for celiac disease using tissue transglutaminase antibodies as first level in a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2002 Nov;97(11):2785-90.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:12445-50.
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science New York, NY* 1998;279:1737-40.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6879-84.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2:255-60.
- Grose RH, Cummins AG, Thompson FM. Deficiency of invariant natural killer T cells in coeliac disease. *Gut*. 2007. 56(6):790-5.
- Grose RH, Thompson FM, Baxter AG, Pellicci DG, Cummins AG. Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2007 Jun;52(6):1415-22.
- Grose RH, Thompson FM, Cummins AG. Deficiency of 6B11+ invariant NK T-cells in celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2008. 53(7):1846-51.
- Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185:1101-11.
- Gujral Naiyana, Freeman Hugh J, Thomson Alan BR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* 2012 November 14; 18(42): 6036-6059 ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online).
- Haas SV. "The value of the banana in the treatment of coeliac disease". *Am J Dis Child* 1924. 24: 421-37.
- Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141(hi) cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103(+) nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012;37:60-73.
- Hao Qian-Lin, George Aswathi A., Zhu Judy, Barsky Lora, Zielinska Ewa, Wang Xiuli, Price Mary, Ge Shundi, and Crooks Gay M.. Human intrathymic lineage commitment is marked by differential CD7 expression: identification of CD7⁻ lympho-myeloid thymic progenitors. *Blood*. 2008 February 1; 111(3): 1318-1326.
- Harding, H. P., Zhang, Y. & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an Endoplasmic - reticulum - resident kinase. *Nature*. 1999. 397, 271-274.

- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000 Nov;6(5):1099-108.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32.
- Hauet-Broere F, Unger WW, Garssen J, Hoijer MA, Kraal G, Samsom JN: Functional CD25S and CD25+mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur J Immunol* 2003, 33:2801-2810.
- Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2001. 2:997–1003.
- Haynes BF, Denning SM, Singer KH, Kurtzberg J. Ontogeny of T-cell precursors: a model for the initial stages of human cell development. *Immunol Today*. 1989;10:87–91.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 1999.10, 3787–3799.
- Henderson KN, Reid HH, Borg NA, Broughton SE, Huyton T, Anderson RP, McCluskey J, Rossjohn J. The production and crystallization of the human leukocyte antigen class II molecules HLA-DQ2 and HLA-DQ8 complexed with deamidated gliadin peptides implicated in coeliac disease. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2007 Dec 1;63(Pt 12):1021-5.
- Herrmann, H. and Aebi, U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2000. 12, 79-90.
- Hershko, A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1997. 9, 788–799.
- Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, Brandt GS, Iwakoshi NN, Schinzel A, Glimcher LH, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α . *Science*. 2006 Apr 28;312(5773):572-6.
- Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2012 Jan 18;13(2):89-102. doi: 10.1038/nrm3270.
- Hetz, C. & Glimcher, L. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol*. 2008. 18, 38–44.
- Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:1-19.
- Hirota K, Turner JE, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM, Stockinger B. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nat Immunol*. 2013 Apr;14(4):372-9. doi: 10.1038/ni.2552.
- Hooper, L. V., Littman, D. R. & Macpherson, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012. 336, 1268–1273.
- Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):3869-76.
- Hudson DA, Cornell HJ, Purdham DR, et al. Non-specific cytotoxicity of wheat gliadin components towards cultured human cells. *Lancet*. 1976 Feb 14;1(7955):339-41.

- Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004 Sep;21(3):367-77.
- Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):5829-35.
- Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, Romanos J, Dinesen LC, Ryan AW, Panesar D, Gwilliam R, Takeuchi F, McLaren WM, Holmes GK, Howdle PD, Walters JR, Sanders DS, Playford RJ, Trynka G, Mulder CJ, Mearin ML, Verbeek WH, Trimble V, Stevens FM, O'Morain C, Kennedy NP, Kelleher D, Pennington DJ, Strachan DP, McArdle WL, Mein CA, Wapenaar MC, Deloukas P, McGinnis R, McManus R, Wijmenga C, van Heel DA. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet*. 2008 Apr;40(4):395-402. doi: 10.1038/ng.102.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54:136–160 (Erratum, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:572)
- Ivanov, I. I. *et al*. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006 126, 1121–1133.
- Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, Dannaeus A, Lindberg T, Lindquist B, Stenhammar L, Hernell O. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr*. 2000 Feb;89(2):165-71.
- Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, Mougnot JF, Allez M, Jian R, Desreumaux P, Colombel JF, Matuchansky C, Cugnenc H, Lopez-Botet M, Vivier E, Moretta A, Roberts AI, Ebert EC, Guy-Grand D, Brousse N, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology*. 2000 May;118(5):867-79.
- Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Dec;9(12):858-70. doi: 10.1038/nri2670.
- Jelínková L, Tucková L, Cinová J, Flegelová Z, Tlaskalová-Hogenová H. Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- α through a mechanism involving NF- κ B. *FEBS Lett*. 2004 Jul 30;571(1-3):81-5.
- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, Bork P, von Mering C. STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(Database issue):D412-6. doi: 10.1093/nar/gkn760.
- Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1249-56.
- Johnston JA, Johnson ES, Waller PR, Varshavsky A. Methotrexate inhibits proteolysis of dihydrofolate reductase by the N-end rule pathway. *J Biol Chem*. 1995 Apr 7;270(14):8172-8.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 1998 Dec 28;143(7):1883-98.
- Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12571-6.

- Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, et al. HumanCD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 2010 207:1247–60
- Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 2002 100:1734–41.
- Karlsson MG, Ludvigsson J. Determination of ARNm expression for IFN γ and IL-4 in lymphocytes from children with IDDM by RT-PCR technique. *Diabetes Res Clin Pract* 1998 Apr;40:21-30.
- Kaser, A., Flak, M.B., Tomczak, M.F., Blumberg, R.S. The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation. *Exp. Cell Res.* 2011 317, 2772 – 2779. Doi : 10.1016 / j. yexcr. 2011.07.008
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol.* 1999 147(7):1431-42.
- Kim JS, Sklarz T, Banks LB, Gohil M, Waickman AT, Skuli N, Krock BL, Luo CT, Hu W, Pollizzi KN, Li MO, Rathmell JC, Birnbaum MJ, Powell JD, Jordan MS, Koretzky GA. Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways. *Nat Immunol.* 2013 Jun;14(6):611-8. doi: 10.1038/ni.2607
- Kimata Y, Kimata YI, Shimizu Y, Abe H, Farcasanu IC, Takeuchi M, Rose MD, Kohno K. Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell.* 2003 Jun;14(6):2559-69.
- Kimata Y, Ishiwata-Kimata Y, Ito T, Hirata A, Suzuki T, Oikawa D, Takeuchi M, Kohno K. Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J Cell Biol.* 2007 Oct 8;179(1):75-86.
- Kopito RR. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell.* 1997 Feb 21;88(4):427-30.
- Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 2000 Dec; 10(12):524-30.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):484-7.
- Koskinen O, Collin P, Korponay-Szabo I, Salmi T, Iltanen S, Haimila K, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K. Gluten-dependent small bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in overt and mild enteropathy coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Oct;47(4):436-42. doi: 10.1097 / MPG. 0b013e31817b6dec.
- Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 2005 23:877-900. Review.
- Kuo, C. T., and J. M. Leiden. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1999 17:149.
- La Cava A, Van Kaer L, Fu Dong S. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol.* 2006 Jul;27(7):322-7. Epub 2006 Jun 2.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.
- László L, Tuckwell J, Self T, Lowe J, Landon M, Smith S, Hawthorne JN, Mayer RJ. The latent membrane protein-1 in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells is found with ubiquitin-protein

- conjugates and heat-shock protein 70 in lysosomes oriented around the microtubule organizing centre. *J Pathol.* 1991 Jul;164(3):203-14.
- Lawson V. Turned on by danger: activation of CD1d-restricted invariant natural killer T cells. *Immunology.* 2012 Sep;137(1):20-7. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03612.x.
- Leffler DA, Schuppan D. Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2010 105:2520–2524.
- Leonard MM, Vasagar B. US perspective on gluten-related diseases. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014. 7:25–37.
- Leonard, W. J. & Spolski, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature Rev. Immunol.* 2005. 5, 688–698.
- Li Y., Guo Y., Tang J., Jiang J., Chen Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochem. Biophys. Sin.* 2014. doi: 10.1093/abbs/gmu048.
- Lieberman LA, Cardillo F, Owyang AM, Rennick DM, Cua DJ, Kastelein RA, Hunter CA. IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *J Immunol.* 2004 Aug 1;173(3):1887-93.
- Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011 Aug;30(4):219-31. doi: 10.3109/08830185.2011.602443.
- Iliev, I. D., Matteoli, G. & Rescigno, M. The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 2007 204, 2253–2257.
- Lebreton C, Ménard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C, Monteiro RC, Fricot A, Traore MG, Griffin M, Cellier C, Malamut G, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology.* 2012. Sep;143(3):698-707.e1-4. doi: 10.1053/j.gastro.2012.05.051.
- Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002 Feb 15;16(4):452-66.
- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N. & Glimcher, L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* 2003. 23, 7448–7459.
- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Anderson, K. C. & Glimcher, L. H. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003. 100, 9946–9951.
- Leishman AJ, Naidenko OV, Attinger A, Koning F, Lena CJ, Xiong Y, Chang HC, Reinherz E, Kronenberg M, Cheroutre H. T cell responses modulated through interaction between CD8alphaalpha and the nonclassical MHC class I molecule, TL. *Science.* 2001. 294:1936–1939
- Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quaratino S, Maiuri L. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol.* 2005.42:913–918.
- Loschi M, Leishman CC, Berardone N, Boccaccio GL. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *J Cell Sci.* 2009 Nov 1;122(Pt 21):3973-82. doi: 10.1242/jcs.051383.
- Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens.* 2003 Feb;61(2):105-17.
- Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quaratino S, Maiuri L. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces

- oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*. 2010 Mar;59(3):311-9.
- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013 Jan;62(1):43-52. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301346.
- Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. Gliadin-specific, HLA-DQ (alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med*. 1993 Jul 1;178(1):187-96.
- MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Pender SL. T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunol. Today*. 1999. 20:505–10.
- Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. 2000. 119:996–1006.
- Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, Ricciardelli I, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol*. 2001. Jan;96(1):150-6.
- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003. 362:30–37.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2007. 8, 741–752.
- Makharia GK. Current and emerging therapy for celiac disease. *Front Med (Lausanne)*. 2014 Mar 24;1:6. doi: 10.3389 / fmed. 2014. 00006.
- Maki M. and Collin P. Coeliac Disease. *The Lancet*. 1997. 349 (9067): 1755-1759.
- Malamut G, Afchain P, Verkarre V, Lecomte T, Amiot A, Damotte D, Bouhnik Y, Colombel JF, Delchier JC, Allez M, Cosnes J, Lavergne-Slove A, Meresse B, Trinquart L, Macintyre E, Radford-Weiss I, Hermine O, Brousse N, Cerf-Bensussan N, Cellier C. Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):81-90. doi: 10.1053 / j.gastro. 2008. 09. 069.
- Malekzadeh R, Sachdev A, Fahid Ali A. Coeliac disease in developing countries: Middle East, India and North Africa. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005 Jun;19(3):351-8.
- Mann ER, Landy JD, Bernardo D, Peake ST, Hart AL, Al-Hassi HO, Knight SC. Intestinal dendritic cells: their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol Lett*. 2013 Feb;150(1-2):30-40. doi: 10.1016/j.imlet.2013.01.007.
- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3066-77.
- Marciniak, S. J. & Ron, D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev*. 2006. 86, 1133–1149.
- Markiewicz MA, Wise EL, Buchwald ZS, Pinto AK, Zafirova B, Polic B, Shaw AS. RAE1ε ligand expressed on pancreatic islets recruits NKG2D receptor-expressing cytotoxic T cells independent of T cell receptor recognition. *Immunity*. 2012 Jan 27;36(1):132-41. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.014.

- Marks, B. R. *et al.* Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nature Immunol.* 2009. 10, 1125–1132.
- Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology.* 1992. Jan;102(1):330-54
- Martin-Pagola A, Ortiz L, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Castano L, Bilbao JR. Analysis of the expression of MICA in small intestinal mucosa of patients with celiac disease. *J Clin Immunol.* 2003. 23(6):498-503.
- Martín-Pagola A, Pérez-Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R, Preciado E, Castaño L, Bilbao JR. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics.* 2004 Nov;56(8):549-54.
- Marzec, M., Eletto, D., Argon, Y. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 2012. 1823, 774–787. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.10.013
- Matysiak-Budnik T, Moura IC, 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 RC, Heyman M. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 2008 Jan 21;205(1):143-54. doi: 10.1084/jem.20071204.
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012 489, 231–241.
- Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, Giliberti P, Cosentini E, Marano C, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Sette A, Troncone R, Gianfrani C. Gliadin activates HLA class I-restricted CD8+ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis. *Gastroenterology.* 2008 Apr;134(4):1017-27. doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.008.
- McGeachy, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nature Immunol.* 2007. 8, 1390–1397.
- McGuire HM, Vogelzang A, Ma CS, Hughes WE, Silveira PA, Tangye SG, Christ D, Fulcher D, Falcone M, King C. A subset of interleukin-21+ chemokine receptor CCR9+ T helper cells target accessory organs of the digestive system in autoimmunity. *Immunity.* 2011 Apr 22;34(4):602-15. doi: 10.1016/j.immuni.2011.01.021.
- McManus R, Wilson AG, Mansfield J, Weir DG, Duff GW, Kelleher D. TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis-alpha gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. *Eur J Immunol.* 1996 Sep;26(9):2113-8.
- Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology.* 2003. 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., *et al.* Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 2004. 21:357–366
- Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee L, Tretiakova M, Semrad C, Kistner E, Winchester RJ, Braud V, Lanier LL, Geraghty DE, Green PH, Guandalini S, Jabri B. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med.* 2006. 203:1343–1355.

- Meresse B, Cerf-Bensussan N. Innate T cell responses in human gut. *Semin Immunol.* 2009. Jun;21(3):121-9. doi: 10.1016/j.smim.2009.01.002.
- Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity.* 2012 Jun 29;36(6):907-19. doi: 10.1016/j.immuni.2012.06.006.
- Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, Wong CH, Schneider E, Dy M, Leite-de-Moraes MC. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):995-1001.
- Middendorp S, Nieuwenhuis EE. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2009 Sep;2(5):393-402. doi: 10.1038/mi.2009.99.
- Mills KGH, Regulatory T cells: friends or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004. 4:841-55.
- Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2011. 11:807–22
- Mittag D, Proietto AI, Loudovaris T, Mannering SI, Vremec D, Shortman K, et al. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J Immunol.* 2011. 186:6207–17.
- Mohamed BM, Feighery C, Kelly J, Coates C, O'Shea U, Barnes L, Abuzakouk M. Increased protein expression of matrix metalloproteinases -1, -3, and -9 and TIMP-1 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *Dig Dis Sci.* 2006 Oct;51(10):1862-8.
- Molinero LL, Fuertes MB, Rabinovich GA, Fainboim L, Zwirner NW. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol.* 2002 May;71(5):791-7.
- Molinero LL, Fuertes MB, Fainboim L, Rabinovich GA, Zwirner NW. Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *J Leukoc Biol.* 2003 Jun;73(6):815-22.
- Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, Zwirner NW. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol.* 2004. 173(9):5583-90.
- Molinero LL, Domaica CI, Fuertes MB, Girart MV, Rossi LE, Zwirner NW. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Hum Immunol.* 2006 Mar;67(3):170-82.
- Monteleone G, Pender SL, Alstead E, Hauer AC, Lionetti P, McKenzie C, MacDonald TT. Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut.* 2001 Mar;48(3):425-9.
- Monteleone I, Sarra M, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Franzè E, Fina D, Fabrizi A, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. *J Immunol.* 2010 Feb 15;184(4):2211-8. doi: 10.4049/jimmunol.0901919.
- Mooney PD, Aziz I, Sanders DS. Non-celiac gluten sensitivity: clinical relevance and recommendations for future research. *Neurogastroenterol Motil.* 2013 Aug 12. doi: 10.1111/nmo.12216.
- Mora, J. R. & von Andrian, U. H. Retinoic acid: an educational "vitamin elixir" for gut-seeking T cells. *Immunity.* 2004. 21, 458–460.
- Mora, M. Litwin, N. Toca M del C. Azcona, M.I. Solis Neffa, R. Battiston, F. Solaegui M. Ortiz G. Wagener M. Olivera J. Marchisone S. Oropeza G. Bastianelli, C. Gonzalez A. Rezzonico G. Prevalence of coeliac disease: multicentric trial among pediatric population from five urban districts in Argentina. *Pediatría.* 2012. 110, 490-496. doi: 10.1590/S0325-00752012000600006.

- Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*. 2005. 66(1):13-20.
- Mortimore GE, Miotto G, Venerando R, Kadowaki M. *Autophagy*. *Subcell Biochem*. 1996. 27:93-135.
- Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, Monteiro RC. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med*. 2001 Aug 20;194(4):417-25.
- Mowat AM, Donachie AM, Parker LA, Robson NC, Beacock-Sharp H, McIntyre LJ, Millington O, Chirido F. The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance. *Novartis Found Symp*. 2003. 252:291-302; discussion 302-5. Review.
- Mowat AM, Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immun*. 2011. 3(6):550-64. doi: 10.1159/000329099. Epub 2011 Sep 19. Review.
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 2007 Jul 13;317(5835):256-60.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1951-7.
- Nadal, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J. Med. Microbiol*. 2007. 56, 1669–1674.
- Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Lundberg I, Rawat R, Cutting S, Thapliyal R, Chang J, Dwivedi S, Mitsak M, Chen YW, Plotz P, Rosen A, Hoffman E, Raben N. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum*. 2005 Jun;52(6):1824-35.
- NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease. *NIH Consens State Sci Statements* 2004;21:1-23.
- Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut*. 1995 Dec;37(6):766-76.)
- Nilsen, E. M., F. L. Jahnsen, K. E. Lundin, F. E. Johansen, O. Fausa, L. M. Sollid, J. Jahnsen, H. Scott, P. Brandtzaeg. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998. 115: 551–563
- Nikulina M, Habich C, Flohé SB, Scott FW, Kolb H. Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1925-33.
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002 Jun 1;16(11):1345-55.
- Nistal E, Caminero A, Herrán AR, Arias L, Vivas S, de Morales JM, Calleja S, de Miera LE, Arroyo P, Casqueiro J. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Apr;18(4):649-56. doi: 10.1002/ibd.21830.
- Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzù G, Momigliano-Richiardi P, Greco L, Stazi MA. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*. 2006 Jun;55(6):803-8.

- Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM. PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis.* 1999 Oct;6(5):450-60.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. & Ron, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* 2001. 153, 1011–1022.
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):480-3.
- Oberhuber G, Vogelsang H, Stolte M, Muthenthaler S, Kummer JA, Radaszkiewicz T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. *Am J Pathol.* 1996 May;148(5):1351-7. Erratum in: *Am J Pathol.* 2009 May;174(5):1981. Kummer, A J [corrected to Kummer, J A].
- Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Oct;11(10):1185-94.
- O'Connor, W., Jr., M. Kamanaka, C. J. Booth, T. Town, S. Nakae, Y. Iwakura, J. K. Kolls, and R. A. Flavell. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat. Immunol.* 2009. 10: 603–609.
- Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, Lanier LL. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity.* 2004 Jun;20(6):757-67.
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2006 Dec;26(24):9220-31.
- Olaussen RW, Johansen FE, Lundin KE, Jahnsen J, Brandtzaeg P, Farstad IN. Interferon-gamma-secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scand J Immunol.* 2002 Dec;56(6):652-64.
- Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 94:12551–6.
- Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 2004. 21:279–88.
- Osborne TB. Our present knowledge of plant proteins. *Science.* 1908 Oct 2;28(718):417-27. Joint recommendations of the physiological and biochemical committees on protein nomenclature. Chittenden RH, Folin O, Gies WJ, Koch W, Osborne TB, Osborne TB, Levene PA, Mandel JA, Mathews AP, Mendel LB. *Science.* 1908 Apr 3;27(692):554-6; Book: *The vegetable proteins*, Thomas Burr Osborne, Longmans, Green, 1909
- Palucka K, Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2002 Aug;14(4):420-31.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41.
- Parra-Medina Rafael, Molano-Gonzalez Nicolás, Rojas-Villarraga Adriana, Agmon-Levin Nancy, Arango Maria-Teresa, Shoenfeld Yehuda, Anaya Juan-Manuel. Prevalence of Celiac Disease in Latin America: A Systematic Review and Meta-Regression *PLoS One.* 2015.10(5): e0124040. Published online 2015 May 5. doi: 10.1371/journal.pone.0124040. PMID: PMC4420463.

- Pasha I, Saeed F, Sultan MT, Batool R, Aziz M, Ahmed W. Wheat allergy & intolerance; recent updates and perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013 Sep 2. [Epub ahead of print].
- Puley JW. Observations on the etiology of idiopathic steatorrhea. *BMJ*. 1954; 2: 1318.
- Peluso I, Fantini MC, Fina D, Caruso R, Boirivant M, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007 Jan 15;178(2):732-9.
- Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol*. 2014. 14, 141-153. doi: 10.1038/nri3608.
- Pietak M. Celiac disease, wheat allergy, and gluten sensitivity: when gluten free is not a fad. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2012. 36:68S–75S.
- Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol*. 2007.123(1):18-29.
- Plot L, Amital H. Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2009 Feb;8(4):316-9. doi: 10.1016/j.autrev.2008.10.001. Epub 2008 Oct 29.
- Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Mäki M, Sanz A, Calvo C, Maluenda C, Westman P, de la Concha EG, Partanen J. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol*. 1998 Mar;59(3):169-75.
- Pott J, Stockinger S, Torow N, Smoczek A, Lindner C, McInerney G, Bäckhed F, Baumann U, Pabst O, Bleich A, Hornef MW. Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility. *PLoS Pathog*. 2012. 8(5):e1002670. doi: 10.1371/journal.ppat.1002670.
- Pott J, Hornef M. Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep*. 2012 Aug;13(8):684-98. doi: 10.1038/embor.2012.96. Epub 2012 Jul 17. Review. PMID: 22801555.
- Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, et al. Characterization of human DNCR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010. 207:1261–71.
- Prause C, Richter T, Koletzko S, Uhlig HH, Hauer AC, Stern M, Zimmer KP, Laass MW, Probst C, Schlumberger W, Mothes T. Ann N Y New developments in serodiagnosis of childhood celiac disease: assay of antibodies against deamidated gliadin. *Acad Sci*. 2009 Sep;1173:28-35. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04638.x.
- Przemioslo, R. T., K. E. Lundin, L. M. Sollid, J. Nelufer, and P. J. Ciclitira. Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon gamma antibody. *Gut*. 1995.36: 874–879.
- Qiao SW, Sollid LM, Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol*. 2009. Feb;21(1):111-7. doi: 10.1016/j.coi.2009.03.004.
- Ráki M, Tollefsen S, Molberg Ø, Lundin KE, Sollid LM, Jahnsen FL. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*. 2006 Aug;131(2):428-38.
- Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):781-90.
- Rescigno M. Dendritic cells in bacteria handling in the gut. *J Leukoc Biol*. 2011 Oct; 90(4):669-72. doi: 10.1189/jlb.0311141. Epub 2011 Jul 19.

- Rivabene R, Mancini E, De Vincenzi M. In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease. *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1453(1): 152-60.
- Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, Jabri B. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol*. 2001 Nov 15;167(10):5527-30.
- Roberts T, Beyers N, Aguirre A, Walzl G. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- beta , and interleukin-4 mRNA levels. *J Infect Dis*. 2007 Mar 15;195(6):870-8.
- Rocca E, Paganuzzi Stamatii A, et al. Effects of gliadin-derived peptides from bread and durum wheats on in vitro cultures of human cell lines. Implications for celiac disease pathogenesis. *Toxicol Lett*. 1983 May;16(3-4):331-8.
- Rostami K, Malekzadeh R, Shahbazkhani B, Akbari MR, Catassi C. Coeliac disease in Middle Eastern countries: a challenge for the evolutionary history of this complex disorder? *Dig Liver Dis*. 2004 Oct;36(10):694-7.
- Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Rev. Immunol*. 2009. 9, 313–323.
- 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., Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*. 2006. 4, e374. doi: 10.1371/journal.pbio.0040374.
- Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Borrelli M, Staiano A, Auricchio S, Troncone R, Monteleone G. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut*. 2002 Feb;50(2):186-90.
- Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett*. 2005 Aug 29;579(21):4851-5.
- Sánchez E, Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Reduced diversity and increased virulence-gene carriage in intestinal enterobacteria of coeliac children. *BMC Gastroenterol*. 2008 Nov 4;8:50. doi: 10.1186/1471-230X-8-50.
- Sanchez, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. Intestinal *Staphylococcus* spp. and virulent features associated with coeliac disease. *J. Clin. Pathol*. 2012. 65, 830–834.
- Sano, R., Reed, J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. 1833, 3460–3470. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028
- Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Dec;51(3):562-8.
- Sanz Y, Sanchez E, Medina M, De Palma G, Nadal I. Microorganisms for improving the health of individuals with disorders related to gluten ingestión. 2009; WO 2009/080862A1.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012. 10:13.
- Schapira M, Maisin JM, Ghilain JM, De Maeght S, Deltenre P, Henrion J. Epidemiology of coeliac disease. *Acta Gastroenterol Belg*. 2003 Jul-Sep;66(3):234-6.

- Schluns KS, Nowak EC, Cabrera-Hernandez A, Puddington L, Lefrançois L, Aguila HL. Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 13;101(15):5616-21.
- Schönthal, A.H., 2012. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*. 2012. 857516. doi:10.6064/2012/857516.
- Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):770-4.
- Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, Nausch N, Tuettenberg J, Steinle A, Cerwenka A, Schadendorf D, Paschen A. Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer*. 2009 Apr 1;124(7):1594-604. doi: 10.1002/ijc.24098.
- Scott BB, Weisbrot LM, Greenwood JD, Bogoch ER, Paige CJ, Keystone EC. Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation. *Arthritis Rheum*. 1997 Mar;40(3):490-8.
- Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012;209:653–60.
- Setty M, Discepolo V, Abadie V, Kamhawi S, Mayassi T, Kent A, Ciszewski C, Maglio M, Kistner E, Bhagat G, Semrad C, Kupfer SS, Green PH, Guandalini S, Troncone R, Murray JA, Turner JR, Jabri B. Distinct and Synergistic Contributions of Epithelial Stress and Adaptive Immunity to Functions of Intraepithelial Killer Cells and Active Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2015 Sep;149(3):681-691.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.013.
- Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, Yu X, Yang L, Tan BK, Rosenwald A, Hurt EM, Petroulakis E, Sonenberg N, Yewdell JW, Calame K, Glimcher LH, Staudt LM. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*. 2004 Jul;21(1):81-93.
- Shamu, C. E. & Walter, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J*. 1996. 15, 3028–3039.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002 Sep 27;297(5590):2275-9.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. & Prywes, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell*. 2002. 3, 99–111.
- Shen, F., Ruddy, M. J., Plamondon, P. & Gaffen, S. L. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF- α -induced genes in bone cells. *J. Leukoc. Biol*. 2005. 77, 388–399.
- Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, Gorman DM, Bowman EP, McClanahan TK, Yearley JH, Eberl G, Buckley CD, Kastelein RA, Pierce RH, Laface DM, Cua DJ. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t⁺ CD3⁺CD4⁺CD8⁻ entheseal resident T cells. *Nat Med*. 2012 Jul 1;18(7):1069-76. doi: 10.1038/nm.2817.
- Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev*. 2001. 182:58-67.
- Shi Y, Vattam KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):7499-509.

- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):151-61.
- Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB, Khosla C. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS One*. 2008 Mar 26;3(3):e1861. doi: 10.1371/journal.pone.0001861.
- Sinigaglia F, D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Rogge L. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol Rev*. 1999 Aug;170:65-72.
- Smith, J. A., Marker-Hermann, E. & Colbert, R. A. Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. 2006. 20, 571–591.
- Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue Transglutaminasa guilt by association? *Gut* 1997. 41:851–52.
- Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002. 2 (9):647-55.
- Sollid, L.M. Intraepithelial Lymphocytes in Celiac Disease: License to Kill Revealed. *Immunity*. 2004 Sep;21(3):303-4.
- Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*. 2012 Jun;64(6):455-60. doi: 10.1007/s00251-012-0599-z.
- Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):294-302. doi: 10.1038/nri3407.
- Speed MA, Wang DI, King J. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nat Biotechnol*. 1996 Oct;14(10):1283-7.
- Spolski, R. & Leonard, W. J. The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Immunol*. 2008. 20, 295–301.
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K. & Brewer, J. W. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol*. 2004. 167, 35–41.
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):285-94.
- Stastny P. Introduction: MICA/MICB in innate immunity, adaptive immunity, autoimmunity, cancer, and in the immune response to transplants. *Hum Immunol*. 2006 Mar;67(3):141-4.
- Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*. 2006 Oct;101(10):2333-40.
- Stepniak D, Koning F. Celiac disease—sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2006;67:460–468.
- Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):2971-6.
- Summers KL, Hock BD, McKenzie JL, Hart DN. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol* 2001;159:285–95.
- Sutherland DR, Rudd CE, Greaves MF. Isolation and characterization of a human T lymphocyte-associated glycoprotein (gp40). *J Immunol*. 1984;133:327–333.

- Tabas, I., Ron, D., Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 2011. 13, 184–190. doi:10.1038/ncb0311-184.
- Tang F, Chen Z, Ciszewski C, Setty M, Solus J, Tretiakova M, Ebert E, Han J, Lin A, Guandalini S, Groh V, Spies T, Green P, Jabri B. Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *J Exp Med.* 2009 Mar 16;206(3):707-19. doi: 10.1084/jem.20071887.
- Tejman-Yarden N, Zlotnik M, Lewis E, Etzion O, Chaimovitz C, Douvdevani A. Renal cells express a functional interleukin-15 receptor. *Nephrol Dial Transplant.* 2005 Mar;20(3):516-23.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, Boccaccio GL. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell.* 2005 Jan;16(1):405-20.
- Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin Stimulation of Murine Macrophage Inflammatory Gene Expression and Intestinal Permeability Are MyD88-Dependent: Role of the Innate Immune Response in Celiac Disease *J Immunol.* 2006 Feb 15;176(4):2512-21.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci.* 2009 Feb 15;122(Pt 4):563-73. doi: 10.1242/jcs.038208.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 2000 Jan 4;19(1):94-102.
- Thuerauf, D. J., Morrison, L. & Glembotski, C. C. Opposing roles for ATF6 α and ATF6 β in endoplasmic reticulum stress response gene induction. 2004. *J. Biol. Chem.* 279, 21078–21084.
- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A. & Kaufman, R. J. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2000. 14, 2725–2736.
- Tirosh, B., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H. & Ploegh, H. L. Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 2006. 281, 5852–5860.
- Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, Sundqvist T, Norin E. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2005 Dec;100(12):2784-8.
- Tjon JM, Verbeek WH, Kooy-Winkelaar YM, Nguyen BH, van der Slik AR, Thompson A, Heemskerk MH, Schreurs MW, Dekking LH, Mulder CJ, van Bergen J, Koning F. Defective synthesis or association of T-cell receptor chains underlies loss of surface T-cell receptor-CD3 expression in enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Blood.* 2008 Dec 15;112(13):5103-10. doi: 10.1182/blood-2008-04-150748.
- Todd D.J., Lee A.H., Glimcher L.H. The endoplasmic Reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2008. 8,663-674. doi: 10.1038/nri2359.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* 2000 Apr 28;101(3):249-58.
- Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, Bakker SF, Bardella MT, Bhaw-Rosun L, Castillejo G, de la Concha EG, de Almeida RC, Dias KR, van Diemen CC, Dubois PC, Duerr RH, Edkins S, Franke L, Fransen K, Gutierrez J, Heap GA, Hrdlickova B, Hunt S, Plaza Izurieta L, Izzo V, Joosten LA, Langford C, Mazzilli MC, Mein CA, Midah 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 SS, Rybak A, Santiago JL, Senapati S, Sood A, Szajewska H, Troncone R, Varadé J, Wallace C, Wolters VM, Zhernakova A; Spanish Consortium on the Genetics of Coeliac Disease (CEGEC); PreventCD Study Group; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), Thelma BK, Cukrowska B, Urcelay E, Bilbao JR, Mearin ML, Barisani D, Barrett JC, Plagnol V, Deloukas P, Wijmenga C, van Heel DA. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet.* 2011 Nov 6;43(12):1193-201. doi: 10.1038/ng.998.
- Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jun;5(6):405-17. Epub 2007 May 8.
- Urano, F. & Wang, X. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase. *Science* 2000. 287, 664–666.
- Vader LW, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YM, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med.* 2002 Mar 4;195(5):643-9.
- Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, Spaenij L, Koning F. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12390-5.
- VAN DE KAMER JH, WEIJERS HA, DICKE WK. Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953 May;42(3):223-31.
- Van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM. Circulating V(alpha24+ Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol.* 2001 Aug;100(2):144-8
- Van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Nishi N, Kölgen W, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol.* 2004 Jul;112(1):8-23.
- Van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011 Mar;32(3):110-6. doi: 10.1016/j.it.2011.01.003. Epub 2011 Feb 18.
- Van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JR, Sanders DS, Howdle P, Swift J, Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P, Wijmenga C. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7):827-9.
- Van Huizen, R., Martindale, J. L., Gorospe, M. & Holbrook, N. J. P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 α signaling. *J. Biol. Chem.* 2003. 278,15558–15564.
- Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res.* 2011 Jan;343(1):43-55. doi: 10.1007/s00441-010-1023-3.
- Vattemi, G., Engel, W. K., McFerrin, J. & Askanas, V. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle. *Am. J. Pathol.* 2004. 164, 1–7.
- Venkataraman GM, Suci D, Groh V, Boss JM, Spies T. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 2007; 178:961–69.

- Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 1999;117:297–303
- Vidair CA, Huang RN, Doxsey SJ. Heat shock causes protein aggregation and reduced protein solubility at the centrosome and other cytoplasmic locations. *Int J Hyperthermia*. 1996 Sep-Oct;12(5):681-95.
- Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J. Immunol*. 1998; 160:5815-25.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:1015-68.
- Volta U, Villanacci V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cell Mol Immunol*. 2011;8:96–102.
- Volta U, Caio G, Tovoli F, De Giorgio R. Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. *Cell Mol Immunol*. 2013 Sep;10(5):383-92. doi: 10.1038/cmi.2013.28.
- Walker-Smith JA. Underutilisation of oral rehydration in the treatment of gastroenteritis. *Drugs*. 1988;36 Suppl 4:61-4.
- Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*. 1998 Oct 1;17(19):5708-17.
- Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem*. 2000 Sep 1;275(35):27013-20.
- Wang N, Shen N, Vyse TJ, Anand V, Gunnarson I, Sturfelt G, Rantapää-Dahlqvist S, Elvin K, Truedsson L, Andersson BA, Dahle C, Orqvist E, Gregersen PK, Behrens TW, Hammarström L. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1383-96. doi: 10.2119/molmed.2011.00195.
- Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 1995 Oct 6;83(1):121-7.
- Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, Baumjohann D, Morton J, Kim SJ, et al. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol* 2014;15:98–108.
- Weiss-Steider B, Soto-Cruz I, Martinez-Campos CA, Mendoza-Rincon JF. Expression of MICA, MICB and NKG2D in human leukemic myelomonocytic and cervical cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Apr 10;30:37. doi: 10.1186/1756-9966-30-37.
- Wesa A, Galy A. Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand. *BMC Immunol* 2002 Oct 18;3:14.
- West J, Logan RF, Hill PG, Khaw KT. The iceberg of celiac disease: what is below the waterline? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jan;5(1):59-62.
- Wetzel R. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol*. 1994 May;12(5):193-8.
- Wieser H, Seilmeier W, Belitz HD. Comparative investigations of partial amino acid sequences of prolamins and glutelins from cereals. VIII. Amino acid sequences of glutelin peptides. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1988 Jul;187(1):27-34.
- Wigley WC, Fabunmi RP, Lee MG, Marino CR, Muallem S, DeMartino GN, Thomas PJ. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol*. 1999 May 3;145(3):481-90.

- Wingender G, Kronenberg M. Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 Jan;294(1):G1-8.
- Wójcik C, Schroeter D, Wilk S, Lamprecht J, Paweletz N. Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Eur J Cell Biol.* 1996 Nov;71(3):311-8.
- Wójcik C. An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome (PSI) induces similar morphological changes in various cell lines. *Folia Histochem Cytobiol.* 1997;35(4):211-4.
- Woolley N, Mustalahti K, Mäki M, Partanen J. Cytokine gene polymorphisms and genetic association with coeliac disease in the Finnish population. *Scand J Immunol.* 2005 Jan;61(1):51-6.
- Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Forster R, Pabst O: Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006, 203:519-527.
- Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell.* 2007 Sep;13(3):365-76.
- Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):15920-5.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999 Oct 15;286(5439):525-8.
- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000 Dec;6(6):1355-64.
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001 Apr 27;276(17):13935-40.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001. 107, 881–891.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M. & Mori, K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 2006. 172, 565–575.
- Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, Iaffaldano L, Iaquinto G, Giardullo N, Lania G, Vigliano I, Vera AR, Ferrara K, Auricchio S, Troncone R, Mazzarella G. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2011 Jul;106(7):1308-17. doi: 10.1038/ajg.2011.80.
- Zebrowska A, Narbutt J, Sysa-Jedrzejska A, Kobos J, Waszczykowska E. The imbalance between metalloproteinases and their tissue inhibitors is involved in the pathogenesis of dermatitis herpetiformis. *Mediators Inflamm.* 2005 Dec 14;2005(6):373-9.

- Zeissig S, Kaser A, Dougan SK, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS. Role of NKT cells in the digestive system. III. Role of NKT cells in intestinal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007. 293(6):G1101-5.
- Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):648-51.
- Zhernakova A, Elbers CC, Ferwerda B, Romanos J, Trynka G, Dubois PC, de Kovel CG, Franke L, Oosting M, Barisani D, Bardella MT; Finnish Celiac Disease Study Group, Joosten LA, Saavalainen P, van Heel DA, Catassi C, Netea MG, Wijmenga C. Evolutionary and functional analysis of celiac risk loci reveals SH2B3 as a protective factor against bacterial infection. *Am J Hum Genet*. 2010 Jun 11;86(6):970-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.05.004.
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 1998 Apr 1;12(7):982-95.
- Zou Y, Mirbaha F, Stastny P. Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing. *Hum Immunol*. 2006 Mar;67(3):183-7.
- Zuniga, L. A., Jain, R., Haines, C. & Cua, D. J. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol. Rev*. 2013. 252, 78–88.
- Zwirner NW, Fernández-Viña MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics*. 1998;47(2):139-48.