



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO Cs. Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Ejes inflamatorios y alarminas en el Intestino Delgado en
Enfermedad Celíaca***

Tesista: Lic. Federico Perez

Director: Prof. Dr. Fernando G. Chirido

Año: 2021

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de La Plata), bajo la dirección del Prof. Dr. Fernando G. Chirido.

Agradecimientos

A mi director, Prof. Dr. Fernando G. Chirido por haber confiado en mí y haberme incorporado a su grupo de investigación para poder realizar este trabajo de tesis, por haberme guiado, asistido y aconsejado para poder afrontar los diferentes desafíos profesionales y personales durante estos últimos años.

Al director del IIFP, Dr. Martín Rumbo, por permitirme realizar este trabajo en el instituto.

A la Dra. Marcela Hermoso y su grupo de la universidad de Chile, por la ayuda y supervisión del análisis del eje IL-33/ST2.

Al Dr. Antonio Carrera Silva, por su apoyo y contribuciones fundamentales en el estudio del eje TAM, y a todo su grupo de trabajo, en especial a Lic. Cinthia Olexen por su colaboración en los análisis estadísticos complejos.

A la Universidad Nacional de La Plata y CONICET por financiar mi doctorado, y los cursos intermedios.

A mis compañeros de grupo: Paula C., Caro R., Ema M., Flor G.C., Flor R., Luz I. y Gero D., por la predisposición a ayudar, aconsejar y compartir buenos momentos que hicieron que las horas de trabajo fueran más entretenidas.

A todos mis compañeros/as de instituto, por haberme aconsejado y asistido a lo largo de toda la tesis.

A mis compañeros de la cátedra de Fisiología, que me enseñaron a trabajar como docente, y me brindaron su buena predisposición y consejo.

A mi familia. A mis padres, Emma y Carlos, que con su ejemplo me infundieron la idea de trabajar por lo que uno anhela, por más difícil que lo parezca. A mi hermana Mili y mi Tía Mónica, por apoyarme y entretenerme siempre. A mis amigos, por alegrarme, ayudarme y acompañarme todos estos años. A Rosario, mi amiga y compañera, que siempre me apoyó, y me brindó su cariño.

Y a todos aquellos que, aunque no estén dentro de estos grupos, me han ayudado en la realización de mi trabajo de tesis.

Tabla de Contenido

1	Introducción General	1-11
1.1	Introducción general a la Enfermedad Celíaca	1-12
1.2	Diagnóstico de la enfermedad celíaca	1-12
1.3	Signos y síntomas de la enfermedad celíaca	1-12
1.3.1	Serología	1-13
1.3.2	Enteropatía	1-14
1.4	Espectro clínico de la enfermedad celíaca	1-17
1.5	Epidemiología de la enfermedad celíaca.....	1-18
1.5.1	Factores genéticos	1-19
1.5.2	Factores ambientales	1-23
1.6	Diferencias entre la enfermedad celíaca y otros desórdenes asociados al consumo de productos con gluten	1-29
1.6.1	Alergia al Trigo	1-30
1.6.2	Sensibilidad al gluten no celiaca (NCGS)	1-30
1.7	Modelos experimentales utilizados en el estudio de diversos aspectos de la enfermedad celíaca	1-31
1.8	Hipótesis general.....	1-34
1.9	Objetivos de la tesis	1-34
1.9.1	Objetivo General	1-34
1.9.2	Objetivos específicos de la parte A	1-34
1.9.3	Objetivos específicos de la parte B	1-35
1.9.4	Objetivos específicos de la parte C	1-36
2	Anexo de la introducción	2-37
2.1	Modelo teórico de la patogenia de la Enfermedad Celíaca	2-38
2.1.1	Desarrollo de un modelo teórico de la patogenia de EC	2-38
2.1.2	Introducción al modelo de patogenia	2-38
2.1.3	Nodos del modelo	2-38
2.1.4	Integración del modelo y factores predisponentes	2-39
2.2	Tabla de genes asociados a SNPs predisponentes de la enfermedad celíaca	2-51
3	Materiales y métodos	3-56
3.1	Biopsias Duodenales de Pacientes	3-57
3.2	Muestras de Sangre de Pacientes	3-57
3.3	Determinación de la concertación en Suero de IL-33 y ST2s.....	3-57
3.4	Inmunofluorescencia de muestras embebidas en Parafina (IFP).....	3-57
3.4.1	Preparación de muestras para IFP	3-57
3.4.2	Procesamiento de muestras en parafina para IFP	3-57
3.5	Inmunofluorescencia de muestras Congeladas (IFFr).....	3-58
3.5.1	Preparacion de muestras para IFFr.....	3-58
3.5.2	Procesamiento de muestras para IFFr	3-58

3.6	Adquisición de Imágenes	3-60
3.7	Procesamiento de Imágenes	3-60
3.7.1	Densidad de Células (δ)	3-60
3.7.2	Proporción de Células (ρ).....	3-60
3.7.3	Densidad Relativa de Fluorescencia (RFD)	3-61
3.8	RT-qPCR	3-61
3.9	Western blot.....	3-63
3.10	Cultivos de líneas celulares	3-65
3.10.1	HT-29.....	3-65
3.10.2	HMEC-1.....	3-65
3.11	Modelos Murinos.....	3-66
3.12	Análisis histológico de muestras de ratón.....	3-66
3.12.1	Procesamiento de las muestras y obtención de imágenes.....	3-66
3.12.2	Recuento de LIEs	3-67
3.12.3	Determinación del ratio V/C	3-67
1.1.1	Interpretación de los resultados del análisis histológico.....	3-67
3.13	Análisis estadísticos.....	3-67
3.13.1	Comparación entre poblaciones	3-67
3.13.2	Análisis de componentes principales (PCA)	3-67
4	Parte A: Análisis de las Alarminas IL-33, IL-1 α y HMGB1 en Intestino Delgado	4-69
4.1	Introducción General a la Parte A	4-70
4.1.1	IL-33.....	4-71
4.1.2	IL-1 α	4-76
4.1.3	HMGB1	4-81
4.2	Justificación e hipótesis general sobre las potenciales relaciones entre los ejes IL-33, IL-1 α , HMGB1 y la Enfermedad Celíaca	4-85
4.3	Objetivos específicos de la parte A	4-86
4.4	Hipótesis de trabajo de la parte A	4-86
4.5	Resultados de la evaluación del eje IL-33/ST2.....	4-87
4.5.1	Evaluación de los niveles de IL-33 y ST2s en suero de pacientes celíacos activos y no celíacos	4-87
4.5.2	Evaluación del nivel de expresión de IL-33, ST2L y ST2s en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos	4-87
4.5.3	Evaluación histológica de la expresión y localización de la IL-33 y su receptor ST2 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos	4-89
4.5.4	Evaluación de células IL-33 ⁺ en la mucosa duodenal de ACD y NC.....	4-90
4.5.5	Evaluación de células ST2 ⁺ en la mucosa duodenal de ACD y NC	4-92
4.5.6	Las células ST2 ⁺ expresan T-bet	4-94
4.5.7	Modulación de la IL-33 epitelial por estímulos inflamatorios	4-95
4.5.8	Modulación de la expresión de IL-33 en un modelo murino de inflamación aguda	4-96

4.5.9	Análisis de la expresión transcripcional de los factores del eje IL-33/ST2 en intestino delgado humano.....	4-99
4.6	Resultados de la alarmina IL-1 α	4-101
4.6.1	Expresión de la alarmina IL-1 α en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos	4-101
4.6.2	Análisis de las células IL-1 α ⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos	4-101
4.6.3	Evaluación del nivel de expresión de IL-1 α en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC	4-102
4.6.4	Evaluación del nivel de expresión transcripcional del sistema IL-1 α /IL-1R1 en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC	4-103
4.7	Resultados de la alarmina HMGB1.....	4-105
4.7.1	Análisis de la expresión de la alarmina HMGB1 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos	4-105
4.7.2	Análisis de la expresión transcripcional de los factores del eje HMGB1/RAGE en intestino delgado humano.....	4-107
4.7.3	Análisis de expresión de HMGB1 por western blot.....	4-108
4.8	Discusión y perspectivas.....	4-109
4.9	Conclusiones.....	4-114
5	Parte B: Análisis de expresión de mediadores inflamatorios en mucosa duodenal.....	5-115
5.1	Introducción general	5-116
5.2	Vía de los Interferones	5-116
5.2.1	Interferones tipo I.....	5-116
5.2.2	Interferones tipo III	5-119
5.2.3	Biomarcadores de actividad de los IFNs tipo I	5-121
5.2.4	Interferones tipo II.....	5-121
5.2.5	IRFs (Factores Reguladores de IFNs)	5-124
5.2.6	Estudios previos de IFNs en la enfermedad celíaca	5-125
5.3	Eje de citoquinas IL-21/IL-17a	5-127
5.3.1	Biología de la citoquina IL-21.....	5-127
5.3.2	Estudios de IL-21 en enteropatía de la enfermedad celíaca	5-128
5.3.3	Biología de la citoquina IL-17A.....	5-128
5.3.4	Estudios sobre IL-17A en Enfermedad Celíaca	5-130
5.4	HIF1 α y VEGFA.....	5-131
5.5	Justificación sobre la evaluación de mediadores inflamatorios en la enfermedad celíaca ...	5-132
5.6	Objetivos específicos de la parte B	5-133
5.7	Hipótesis de Trabajo	5-133
5.8	Resultados.....	5-134
5.8.1	Nivel de expresión de IFNs tipo I y II.....	5-134
5.8.2	Niveles de IL-10 en pacientes celíacos	5-134
5.8.3	Nivel de expresión de bio-marcadores de los IFNs tipo I y II.....	5-135
5.8.4	Niveles de expresión de IFNs tipo III	5-137

5.8.5	Niveles de expresión de genes <i>VEGFA</i> y <i>HIF1A</i>	5-138
5.8.6	Evaluación del eje de citoquinas IL-17A/IL-21 en pacientes ACD	5-139
5.8.7	Análisis de tendencias poblacionales del sistema IL-17A/IL-21.....	5-143
5.8.8	Análisis en conjunto de las vías estudiadas	5-144
5.9	Discusión y perspectivas futuras	5-147
5.10	Conclusiones.....	5-152
6	Parte C: Análisis de la expresión del sistema “TAM” en mucosa duodenal	6-153
6.1	Introducción general al Sistema “TAM”.....	6-154
6.2	El sistema TAM como controlador de la respuesta adaptativa	6-155
6.2.1	Regulador tardío de la activación de células T en órganos linfoides secundarios (OLS)	6-155
6.2.2	Regulador de las células adaptativas T y B efectoras.....	6-156
6.3	El rol sistema TAM en la remoción de los cuerpos apoptóticos	6-156
6.4	El sistema TAM y la reparación de heridas	6-157
6.4.1	Agregación plaquetaria	6-157
6.4.2	Angiogénesis.....	6-157
6.4.3	Estabilización de la barrera endotelial.....	6-158
6.5	El sistema TAM y el control de la proliferación celular:	6-158
6.6	El sistema TAM y el control de la respuesta inmune innata y la homeostasis con la microbiota	6-158
6.6.1	Regulación de las células innatas	6-158
6.6.2	Regulación de la homeostasis en la microbiota oral:	6-159
6.7	Importancia y justificación del estudio del eje TAM en la enfermedad celíaca:.....	6-161
6.8	Objetivos específicos de la parte C	6-162
6.9	Hipótesis de Trabajo de la parte C	6-162
6.10	Resultados experimentales.....	6-163
6.10.1	Nivel de expresión génica de los ligandos TAM en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos (ACD) y no celíacos (NC)	6-163
6.10.2	Control de la expresión de los ligandos TAM en un modelo endotelial.....	6-164
6.10.3	Nivel de expresión de los ligandos TAM en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos (ACD) y no celíacos (NC):	6-165
6.10.4	Análisis de las diferentes células que expresan Gas6 en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC	6-168
6.10.5	Análisis de las diferentes células que expresan Pros1 en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC	6-170
6.10.6	Estudio de la expresión genética de los receptores TAM en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC.....	6-172
6.10.7	Estudio de la expresión de los receptores TAM en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC	6-174
6.10.8	Estudio de la expresión de Tyro3 y Axl en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC	6-176
6.10.9	Análisis de las células TAM ⁺ en mucosa duodenal.....	6-178

6.11	Discusión y perspectivas	6-183
6.12	Conclusiones.....	6-187
7	Comentario final integrador	7-188
8	Referencias Bibliográficas	8-192

Parte de los resultados y observaciones de este Trabajo de Tesis conforman las siguientes publicaciones:

p31-43 Gliadin Peptide Forms Oligomers and Induces NLRP3 Inflammasome/Caspase 1- Dependent Mucosal Damage in Small Intestine.

Gómez Castro MF, Miculán E, Herrera MG, Ruera C, Perez F, Prieto ED, Barrera E, Pantano S, Carasi P, Chirido FG. *Front Immunol.* 2019 Jan 30;10:31.

doi: 10.3389/fimmu.2019.00031.

IL-33 Alarmin and Its Active Proinflammatory Fragments Are Released in Small Intestine in Celiac Disease.

Perez F, Ruera CN, Miculan E, Carasi P, Dubois-Camacho K, Garbi L, Guzman L, Hermoso MA, Chirido FG. *Front Immunol.* 2020 Oct 8;11:581445.

doi: 10.3389/fimmu.2020.581445.

Sterile inflammation drives multiple programmed cell death pathways in the gut.

Ruera CN, Miculán E, Pérez F, Ducca G, Carasi P, Chirido FG. *J Leukoc Biol.* 2021 Jan;109(1):211-221.

doi: 10.1002/JLB.3MA0820-660R.

Programmed Cell Death in the Small Intestine: Implications for the Pathogenesis of Celiac Disease.

Perez F, Ruera CN, Miculan E, Carasi P, Chirido FG. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 10;22(14):7426.

doi: 10.3390/ijms22147426.

1 Introducción General

1.1 Introducción general a la Enfermedad Celíaca

La enfermedad celíaca (EC) es un desorden inflamatorio crónico del intestino delgado que se presenta en personas genéticamente susceptibles que consumen un grupo de proteínas de trigo, que comúnmente se denominan gluten. De esta forma, se la considera una enfermedad de base inmune pero multifactorial con contribuciones tanto genéticas (siendo los alelos de HLA-DQ2 y DQ8, los de mayor impacto), como ambientales (infecciones, dieta, estrés, etc). Entre los potenciales factores ambientales que contribuyen al desencadenamiento de EC se consideran a las infecciones virales, tiempo de introducción del gluten a la dieta, modificaciones en la microbiota intestinal, entre otros.

La EC una patología de muy alta prevalencia en población general, siendo de aproximadamente 1% a nivel mundial (Abadie *et al.*, 2011). Aunque presenta ciertas características autoinmunes (Parzanese *et al.*, 2017), se debe mencionar que, a diferencia de las enfermedades autoinmunes, en la EC el componente que desencadena la respuesta inmune no es un autoantígeno, sino un componente alimentario. Es por ello, que solamente la adherencia estricta a una dieta de exclusión consumiendo sólo productos libres de gluten permite revertir el daño en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos. Es interesante resaltar que la EC no es la única entidad clínica ocasionada por una intolerancia al gluten, sino que también podemos encontrar a la alergia a las proteínas de trigo y la denominada sensibilidad al gluten no celíaca (NCGS). En esta última, de muy difícil diagnóstico, la respuesta adaptativa específica no parece estar involucrada, aunque se presenta con síntomas y características similares a la EC clásica, y también es tratada con la dieta de exclusión (Abadie *et al.*, 2011; Parzanese *et al.*, 2017).

1.2 Diagnóstico de la enfermedad celíaca

El protocolo habitual de diagnóstico de la EC consiste en la evaluación clínica, serológica e histológica de piezas de biopsias duodenales. Un conjunto de signos y síntomas asociados a la enfermedad (ver subsección siguiente), constituyen la sospecha clínica de EC. Sin embargo, la presencia de una gran población asintomática o con presentaciones atípicas de la enfermedad (20-50% de los celíacos) dificultan la detección de EC y llevan a que esta patología tenga un elevado subdiagnóstico. Es por ello, que el personal médico debe estar en alerta frente a síntomas en parientes de celíacos de primer grado, y personas que presenten enfermedades o síndromes fuertemente asociados a la enfermedad (Psoriasis, Síndrome de Sjörger, Déficit de IgA, Diabetes Mellitus tipo 1, Artritis Reumatoidea, Síndrome de Down, Tiroiditis autoinmune, entre otras) (Cataldo *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2013; Cohn, Sofia and Kupfer, 2014; Dahan *et al.*, 2016; Pavlovic, Berenji and Bukurov, 2017; Abdulrazzaq *et al.*, 2018; Bartoloni *et al.*, 2019). En caso de sospecha de EC, se procede a la evaluación de un panel de anticuerpos en sangre periférica. Finalmente, se buscan alteraciones histológicas en la mucosa duodenal características de EC. Los detalles de cada evaluación se encuentran desarrollados a continuación.

1.3 Signos y síntomas de la enfermedad celíaca

A mediados del siglo pasado, la EC se observaba en población pediátrica con presencia de diversos síntomas y signos causados principalmente por un cuadro severo de malnutrición. La malabsorción intestinal es frecuente en estos casos y es ocasionada por

la progresión de la enfermedad no tratada. Los síntomas intestinales son: dolor intestinal y malestar general acompañados de signos como diarrea, flatos fétidos, constipación, vómitos recurrentes, baja talla y bajo peso. Sin embargo, en las últimas décadas se ha descubierto que la sintomatología es mucho más amplia, y que su epidemiología presenta apariciones no solo en poblaciones pediátricas, sino también adultas. De este modo, hoy conocemos que la EC puede presentarse como un conjunto de síntomas asociados no solo a problemas intestinales, sino también sistémicos. Entre los síntomas extraintestinales cabe mencionar problemas relacionados con la piel, el hígado, las articulaciones, problemas óseos, alteraciones del esmalte dental, coagulopatías, problemas de fertilidad, problemas cardíacos y neuropatías periféricas (Ludvigsson *et al.*, 2013; Parzanese *et al.*, 2017).

1.3.1 Serología

La evaluación serológica es un punto fundamental en el diagnóstico de EC. El panel de anticuerpos empleados se describe en la **Tabla 1** (Rashid and Lee, 2016; Husby, Murray and Katzka, 2019):

1.3.1.1 Anticuerpos anti-Gliadinas

Fue el primer ensayo serológico que se utilizó en el diagnóstico de EC. Esta prueba consta de un ensayo por la técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), para la detección de anticuerpos anti-gliadinas de isotipo IgA o IgG en el suero de pacientes. La falta de estandarización de las mezclas de gliadinas utilizadas como antígeno en los ensayos comerciales generaban resultados poco reproducibles, baja sensibilidad y especificidad, por lo que esta determinación ha dejado de emplearse en el estudio de EC, pero es de utilidad para la evaluación de sensibilidad al gluten no celiaca (NCGS).

1.3.1.2 Anticuerpos anti-Endomisio (EMA)

Esta determinación consta de la evaluación de la presencia anticuerpos de isotipo IgA o IgG capaces de unirse a proteínas presentes en el endomisio de la musculatura del esófago o del cordón umbilical humano y generar un patrón único en inmunofluorescencia indirecta. Cuando se analiza la reactividad del isotipo IgA, esta determinación presenta altísima especificidad (difícilmente se encuentran falsos positivos), pero una sensibilidad menor (cercana al 70-80%). Es una técnica de gran ayuda en la detección de EC; sin embargo, presenta como inconveniente la necesidad de cortes de secciones de esófago de mono y es necesario realizar una técnica de inmunofluorescencia con observadores entrenados. Cuando se analiza el isotipo IgG, la prueba no presenta buenos resultados ya no se observa un patrón tan claro de fluorescencia. Existe una limitación que debe ser tenida en cuenta. Dado que EC se encuentra fuertemente asociada a déficit selectivo de IgA (1-2% de la población celiaca), esta determinación, al igual que en las pruebas de ELISA, presenta falsos negativos en esos pacientes. Por esta razón, todas las determinaciones de serología se acompañan de la cuantificación de IgA total en sangre periférica.

1.3.1.3 Anticuerpos anti-Gliadinas Deamidadas (DPG)

Este es una determinación mediante la técnica de ELISA, donde los diferentes ensayos comerciales emplean péptidos de síntesis con posiciones deamidadas de glutaminas. Estas secuencias han mostrado generar ensayos de mayor eficiencia analítica que las secuencias de gliadinas nativas.

1.3.1.4 Anticuerpos anti-Transglutaminasa 2 (TG2)

En 1997, Dieterich W y col., mostraron que la reactividad de los anticuerpos anti-endomisio era mayoritariamente debida al reconocimiento de la enzima transglutaminasa 2 (TG2). Esto posibilitó el desarrollo de pruebas serológicas basadas en la técnica de ELISA para evaluar la reactividad de los anticuerpos anti-TG2 de isotipo IgA e IgG, siendo la determinación de anticuerpos de isotipo IgA la de mayor eficiencia analítica (Villalta *et al.*, 2010).

Antígeno	Isotipo	Formato	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
Gliadinas	IgA	ELISA	85 (57-100)	90 (47-94)
	IgG	ELISA	80 (42-100)	80 (50-94)
Endomisio	IgA	IFP	95 (86-100)	99 (97-100)
	IgG	IFP	80 (70-90)	97 (95-100)
TG2	IgA	ELISA	98 (78-100)	98 (90-100)
	IgG	ELISA	70 (45-95)	95 (94-100)
DPG	IgA	ELISA	88 (74-100)	90 (80-95)
	IgG	ELISA	80 (70-95)	98 (95- 100)

Tabla 1- Ensayos serológicos empleados en la detección de EC (Rashid and Lee, 2016).IC: intervalo de confianza. IFP: Inmunofluorescencia, ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

1.3.2 Enteropatía

La presencia de enteropatía en el intestino delgado es considerada el “gold standard” en el diagnóstico de EC (Ludvigsson *et al.*, 2013). El análisis histológico se realiza sobre al menos 4 piezas de mucosa de intestino delgado correctamente orientadas obtenidas por endoscopia de bulbo y segunda porción del intestino delgado. Si en al menos una de ellas se observan alteraciones típicas junto con una serología positiva, se confirma el diagnóstico y se procede al tratamiento del paciente con una estricta dieta libre de gluten. Los hallazgos histológicos de la enteropatía han generado diferentes sistemas de clasificación, siendo la descripción original de Marsh M (Marsh, 1992) la base de estas clasificaciones (**Tabla 2**), que se basan en observar las siguientes características:

1.3.2.1 El aumento de linfocitos intraepiteliales (LIEs)

Usualmente este recuento se realiza por un patólogo experimentado por observación de una tinción de Hematoxilina y Eosina del corte histológico correctamente orientado. En una histología convencional, los LIEs son identificados por características morfológicas: núcleo denso compacto, con coloración intensa, citoplasma más claro y de menor área que el de los enterocitos circundantes, y ausencia de la localización su núcleo en fila con los núcleos de los enterocitos. Sin embargo, algunas unidades de diagnóstico prefieren realizar el recuento mediante la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD3. Esta determinación presenta un error más bajo, y es menos susceptible a la subjetividad del operador. Actualmente el límite de corte normal aceptado

para el número de LIE cada 100 enterocitos es de 25 o 30 según la clasificación que se adopte (Villanacci *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Atrofia Vellositaria

Normalmente la mucosa intestinal presenta una histología con vellosidades alargadas extendiéndose hacia la luz intestinal. Al mismo tiempo, por debajo del nivel del inicio de las vellosidades se observan las criptas como invaginaciones de la mucosa. En la enteropatía, las vellosidades pierden altura y suele estar acompañadas de edema y/o un infiltrado linfocitario. Al mismo tiempo, las células epiteliales sufren una transformación citológica caracterizada por presentar menor cantidad de citoplasma, presencia de vacuolas y un borde en cepillo menos desarrollado. Además, se puede notar que las criptas suelen hacerse más largas y abundantes. Esto se denomina hipertrofia de las criptas, con un aumento del número de mitosis en las mismas (hiperplasia). Dado que cuando existe enteropatía se observa la disminución en la altura de las vellosidades y el aumento de la profundidad de las criptas, se estableció una relación V/C: Altura de vellosidad / profundidad de la cripta, que puede ser determinada por morfometría del tejido. De forma tal que la relación V/C disminuye con la severidad de la enteropatía. Se considera a 3:1 como el número de corte para una relación V/C normal para la clasificación de Marsh-Oberhuber (Villanacci *et al.*, 2011).

En el Servicio de Patología del Hospital de Niños de La Plata (Dr. Drut) empleó esta relación para proponer una clasificación de la enteropatía

- Grado 1: ratio V/C entre 2.5-2.
- Grado 2: ratio V/C entre 1-2.
- Grado 3: ratio V/C entre 1-0.5.
- Grado 4: ratio V/C < 0.5.

De esta forma, el grado 0 es decir una mucosa “normal” con un V/C superior a 3-2.5. Mientras que el grado 4 presenta el máximo nivel de daño (Drut and Ruia, 2001).

Marsh Oberhuber	LIE/100 IEC	Hiperplasia de Criptas	Atrofia de Vellosidad	V/C
Tipo 0 "Normal"	<25-30	Normal	Normal	>3:1
Tipo 1 "Infiltrativa"	>25-30	Normal	Normal	>3:1
Tipo 2 "Hiperplásica"	>25-30	Aumenta	Normal	<3:1
Tipo 3a "Destructiva"	>25-30	Aumenta	Leve	<3:1
Tipo 3b "Destructiva"	>25-30	Aumenta	Marcada	<3:1
Tipo 3c "Destructiva"	>25-30	Aumenta	Completa	<3:1

Tabla 2- Clasificaciones de la Enteropatía.

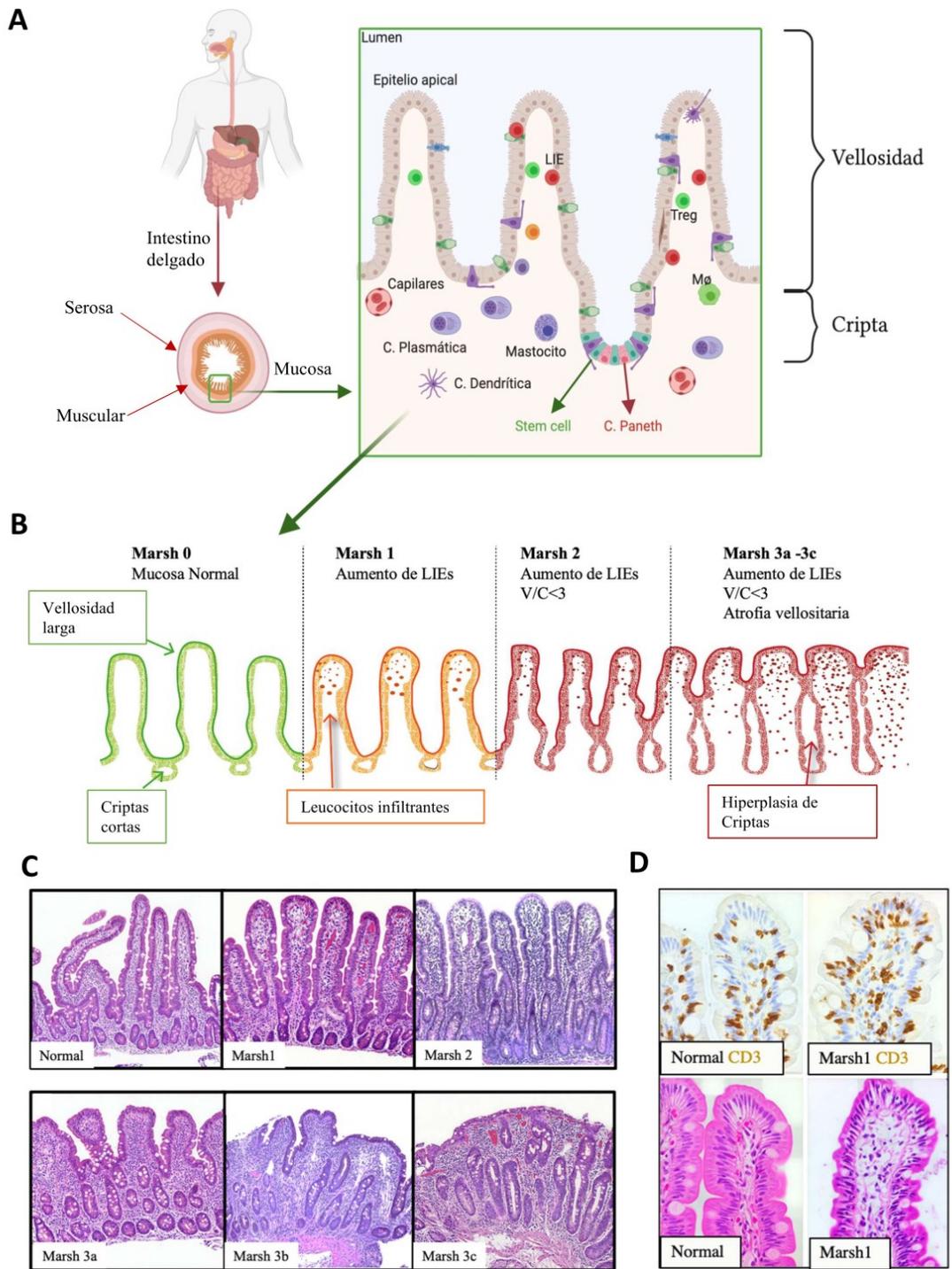


Figura 1- Hallazgos histológicos de la mucosa duodenal en la enfermedad celíaca. A.- Esquema del intestino delgado y de la mucosa duodenal (LIE: Linfocito Intraepitelial, Mφ: Macrófago, Treg: Célula T regulatoria). **B.-** Esquema de grados de enteropatía de Marsh-Oberhuber (modificado de FocusINCD) **C.-** Micrografías obtenidas a 200X final de tejidos con diferentes grados de enteropatía teñidos con Hematoxilina-Eosina. Imágenes obtenidas de

(Smyrk, 2017). **D.**- Figura a 400X de aumento donde se muestran los LIEs mediante una reacción Inmunohistoquímica contra CD3 y en una tinción de Hematoxilina-Eosina. Se muestra a la izquierda un tejido normal y a la derecha un tejido con infiltrado de linfocitos en epitelio (Marsh 1). Imágenes obtenidas de (Cooper *et al.*, 2020).

1.4 Espectro clínico de la enfermedad celíaca

La EC presenta un espectro muy amplio de presentaciones clínicas. Las mismas han sido estudiadas en detalle con la finalidad de realizar una detección más eficiente de esta enfermedad (Rewers, 2005; Abadie *et al.*, 2011; Lionetti and Catassi, 2011). En la **Tabla 3**, se resumen los diferentes tipos de presentación clínica.

La presentación “**Clásica**” o llamada **celíacos activos típicos**, se observa comúnmente en pacientes pediátricos entre los 6 meses y los 2 años (Lionetti and Catassi, 2011; Ludvigsson *et al.*, 2013). Los síntomas más comunes están relacionados a la malabsorción e inflamación intestinal. Entre ellos: diarrea crónica, distensión abdominal, esteatorrea, pérdida del apetito, anemia, baja talla y bajo peso.

La presentación “**No Clásica**” o atípica, se compone de individuos con un rango de edad superior al anterior, con la aparición de síntomas intestinales diferentes como vómitos recurrentes, dolores abdominales recurrentes y constipación. Sin embargo, estos pacientes no presentan signos marcados de malabsorción intestinal. Por otro lado, si pueden presentar aftas en la boca y alteración del esmalte dental. Curiosamente, se ha encontrado presentaciones intestinales acompañadas de anemia ferropénica o por déficit de vitaminas del grupo B. Entre las presentaciones extraintestinales se destacan las de la piel, siendo la dermatitis herpetiforme la más frecuente (Lionetti and Catassi, 2011). Esta presentación se caracteriza por presencia de vesículas en la piel con evidencia de depósitos dérmicos de IgA en las zonas afectadas. Otros síntomas incluyen trastornos óseos evidenciados por una clara desmineralización que, en pacientes adultos, puede desencadenar en osteoporosis. También se observa infertilidad masculina y femenina que podrían asociarse a la cantidad de hierro, folatos, y zinc en sangre.

Tanto la forma clásica como la no clásica presentan positividad a las diferentes pruebas serológicas mencionadas, y pueden mostrar diferentes grados (Marsh I o superior) de enteropatía. En todos los casos estos pacientes responden positivamente a la dieta libre de gluten, lo que se evidencia por la ausencia de síntomas y un escore de Marsh igual o menor a I luego de pocos meses de haber iniciado el tratamiento.

Existen otras dos presentaciones más complejas. Una es la **Enfermedad Celíaca asintomática**, antiguamente denominada silenciosa o silente. Esta presentación se caracteriza por ausencia de los síntomas, o presencia de síntomas más difusos como puede ser ataxia, o fatiga crónica. Sin embargo, en grandes ensayos poblacionales estos pacientes son detectados por la presencia de una serología positiva que conlleva a la realización del protocolo diagnóstico y cuya positividad converge en el inicio del tratamiento eficaz con la dieta libre de gluten. La otra forma es la **Enfermedad Celíaca Potencial** que se caracteriza por una ausencia de síntomas y presencia de un aumento leve de LIEs en el intestino y positividad serológica. Estos pacientes responden satisfactoriamente a la dieta libre de gluten. Es común que estos pacientes sean parientes de primer grado de casos celíacos (Ludvigsson *et al.*, 2013).

Los pacientes **celíacos en tratamiento** con adherencia estricta a la dieta son asintomáticos, serológicamente negativos, y no presentan atrofia vellositaria. Sin

embargo, es común encontrar un elevado número de LIEs, principalmente de linfocitos T con receptor gamma/delta.

Finalmente, mencionamos a la **Enfermedad Celíaca refractaria**. Esta la forma clínica más grave dado que se caracteriza por la ausencia de respuesta a la dieta de exclusión después de 12 meses de su comienzo. Esta presentación puede subdividirse en dos subtipos. El subtipo 1 que presenta un infiltrado de LIEs de tipo clásico, mientras que el subtipo 2, presenta una expansión clonal aberrantes de LIEs comúnmente de tipo célula T gamma/delta. Esta es una condición neoplásica que tiene un mal pronóstico.

Características	Activos típica	Activos atípica	Asintomática	Potencial	Tratados	Refractaria
Anticuerpos	+	+	+	+	-	+
Atrofia Vellositaria	Marsh I-III	Marsh I-III	Marsh I-III	Marsh I	-	Marsh I-III
Aumento de LIEs	+ (Tαβ y Tγδ)	+ (Tαβ y Tγδ)	+ (Tαβ y Tγδ)	+ (Tαβ y Tγδ)	+ (Tγδ)	+ (Tαβ y Tγδ)
Síntomas	típicos	atípicos	ausente o extraintestinales	ausentes	ausentes	típicos o atípicos
Respuesta a la (DLG)	Responde	Responde	Responde	Responde	Se encuentra en DLG	No responde

Tabla 3- Características de las diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad celíaca. Tαβ: células T con TCR alfa-beta, Tγδ: células T con TCR gamma-delta, DLG: Dieta libre de gluten.

1.5 Epidemiología de la enfermedad celíaca

EC es una patología de muy alta prevalencia en población general. Estudios por metanálisis mostraron que la prevalencia global de la EC, estimada en función de la seroprevalencia, es del 1,4%, mientras que la prevalencia mediante diagnóstico por biopsia fue del 0,7%. Aunque la seroprevalencia puede generar una sobreestimación, la prevalencia determinada por biopsia produce una subestimación, ya que no todas las personas evaluadas mediante serología siguen luego una evaluación endoscópica. Por lo que, en general, se considera que la prevalencia promedio de la población es del 1%, aunque existen diferencias entre poblaciones y regiones (Lebwohl and Rubio-Tapia, 2021).

Como mencionamos, la EC se encuentra asociada a varias patologías. Cuando se evalúan individuos con alta predisposición (parientes de primer grado de un caso celíaco, pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1, Artritis Reumatoidea, Anemia, Síndrome de Down, infertilidad, osteoporosis, déficit de IgA, etc.) la prevalencia de EC promedio aumenta al 4.5% (Parzanese *et al.*, 2017). A nivel mundial, la prevalencia varía significativamente cuando se comparan países como Argelia donde la prevalencia es de

5.6% y otros como Rusia con 0.2% (Abadie *et al.*, 2011). Originalmente, la variabilidad podía explicarse por diferencias en la distribución de genes de predisposición, en especial HLA-DQ2/DQ8, la cantidad de gluten consumida y la utilización de diversos métodos diagnóstico serológico. Si bien los dos primeros factores tienen una débil pero significativa correlación con la prevalencia de la enfermedad, los índices de Pearson de dichas comparaciones son muy bajos como para postular a estos factores como responsables de la enfermedad (Abadie *et al.*, 2011; Lionetti *et al.*, 2015). A su vez, se debe considerar que la población general presenta un ~30% de individuos HLA-DQ2⁺ y/o DQ8⁺ que consumen gluten regularmente pero no son celíacos (Sollid *et al.*, 1989). Asimismo, la prevalencia de la enfermedad es de un 50% entre gemelos monozigotos y en un 12% en los dizigotos (Kuja-Halkola *et al.*, 2016). Todo ello sugiere la existencia de otros factores no solamente genéticos, sino también ambientales, que determinan la patogenia de la enfermedad (Abadie *et al.*, 2011).

1.5.1 Factores genéticos

Los factores genéticos estudiados son muy diversos, y están asociados a múltiples loci en diferentes cromosomas. No obstante, se debe destacar que un gran número de los genes implicados corresponden a funciones del sistema inmune y se encuentran relacionados con otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Louka and Sollid, 2003; Abadie *et al.*, 2011). Entre ellos, los genes de susceptibilidad de HLA de clase II presentan la asociación más fuerte. Estos, a su vez, constituyen una de las asociaciones más fuertes (mayor riesgo relativo) entre un gen HLA y una enfermedad. En la **Figura 2**, se esquematizan los diferentes haplotipos y fenotipos más relevantes. Dentro de los genes HLA, existen diferentes haplotipos asociados a diferentes grados de riesgo con la enfermedad. Los haplotipos relacionados con una mayor predisposición son aquellos que codifican para el heterodímero HLA-DQ2.5: en sus dos configuraciones *cis* “DR3-DQ2”: DQB1*0201, DQA1*0501; o *trans* “DR5-DQ7”: DQB1*0301, DQA1*0505 y “DR7-DQ2”: DQB1*0202, DQA1*0201. Se ha demostrado que el haplotipo “DR3-DQ2”: DQB1*0201, DQA1*0501 presentan un efecto de dosis con la prevalencia de la enfermedad. Esto quiere decir que heredar el haplotipo de ambos progenitores presenta una mayor predisposición a desarrollar la enfermedad que al heredar un solo haplotipo. Por otro lado, se observa una menor predisposición para los haplotipos codificantes del HLA-DQ8: “DR4-DQ8”: DQB1*0302, DQA1*03. Por último, el haplotipo codificante para la molécula HLA-DQ2.2 (“DR7-DQ2”: DQB1*0202, DQA1*0201) presenta un riesgo bajo, pero estadísticamente significativo en la predisposición a la patología (Sollid *et al.*, 1989; Louka and Sollid, 2003; Abadie *et al.*, 2011).

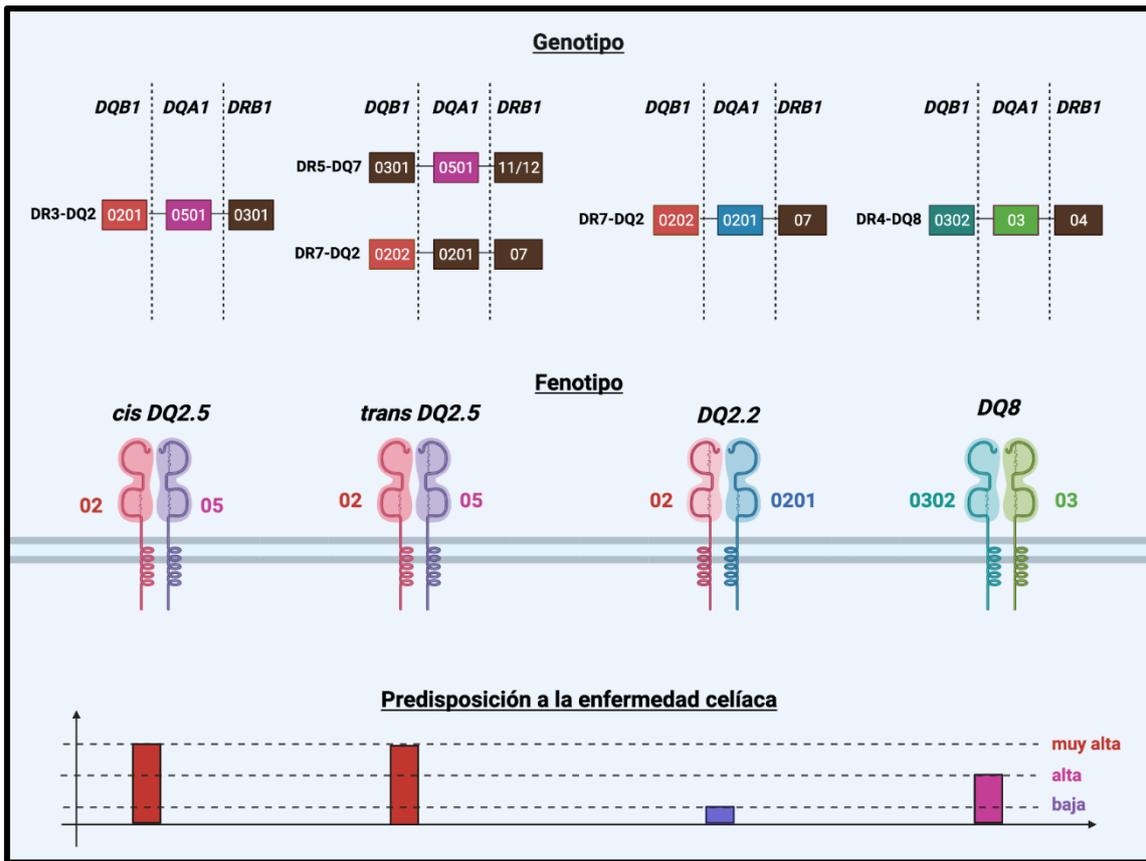


Figura 2- Infografía de los factores genéticos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 asociados a la EC. En la parte superior se muestran los posibles genotipos asociados a la EC. Por debajo se muestran los fenotipos resultantes, y más abajo se muestran cualitativamente el correspondiente grado relativo de predisposición con la enfermedad. Modificado de (Abadie *et al.*, 2011).

También se han encontrado asociaciones menores con otros genes HLA. Entre ellas están los alelos del HLA-B (HLA-B*08 y HLA-B*39:06); el HLA-DPb1 y dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que afectan la expresión del HLA-F y el HLA-DPB1 (Gutierrez-Achury *et al.* 2015). La fuerte asociación de estos alelos HLA y la enfermedad sugiere un rol fundamental en la patogenia de la EC que se discutirá más adelante.

Aunque los alelos HLA-DQ2/DQ8 se encuentran en prácticamente todos los pacientes celíacos (Louka y Sollid 2003), estudios de asociación, muestran que los alelos HLA contribuyen solamente en 22-35% a la predisposición genética. Por lo tanto, otras regiones génicas deben contribuir a la susceptibilidad a la patología (Abadie *et al.*, 2011). Debido al desarrollo de métodos de genotipificación masiva más económicos (GWAS y el ImmunoChip) se han encontrado un gran número de variantes genéticas asociadas a la enfermedad, tanto fuera como dentro de la región HLA. Es así como varios SNPs diferentes se encuentran enriquecidos en poblaciones de pacientes celíacos. Los SNPs encontrados relacionan 42 regiones genéticas por el método de desequilibrio de ligación (del inglés “*linkage disequilibrium*”) con la aparición de la EC. Dentro de estas regiones, se encuentran 57 genes fuera de la región de HLA, y 5 dentro de ésta (ver **Tabla 6**). Dentro de este conjunto de genes es notorio el gran número de los cuales están relacionados con funciones diversas del sistema inmune tanto adaptativo como del innato (**Figura 3**). Por todo ello, podemos decir que la EC es una enfermedad poligénica, con

contribuciones de varios genes de bajo peso individual (Dieli-Crimi, Cénit and Núñez, 2015; García-Santisteban *et al.*, 2021).

Nuevos estudios señalan una importante contribución de la epigenética en la susceptibilidad genética a la EC. El 90% de los SNPs asociados a EC se encuentran en regiones no codificantes de proteínas. Se estima que cerca del 50% de ellos son *cis* eQTLs (“Expression quantitative trait loci”) o loci genómicos que regulan la producción de ARNm de genes vecinos (ver **Tabla 6**). Además, los denominados ARN no codificantes (ARNnc), ejercen efectos regulatorios de la transcripción de otros genes, con consecuencias relevantes en el control de diversas funciones celulares. Dentro de los ARNnc se han estudiado los ARNnc pequeños (<30 pb), principalmente los micro ARN (micro-ARN), y los largos (>30 pb, “ARNlnc”). Los hallazgos se mencionan en la **Tabla 4**.

Tipo de ARNnc	Nombre del ARNnc	Población celiaca	Rol del ARNnc
micro ARN	miR-124a	Disminuido en ACD y CD en DLG	Influencia la maduración de Tregs
	miR-189	Disminuido en ACD y CD en DLG	Desconocida, implicada en síndrome de Tourette
	miR-299-5p	Disminuido en ACD y CD en DLG	Suprime la autofagia por medio de inhibir al Atg5
	miR-379	Disminuido en ACD y CD en DLG	Inhibe la transición Epitelio/mesenquimal en cáncer de colon
	miR-449a	Aumentado en ACD y CD en DLG	Desregula vía NOTCH1, Aumenta proliferación de IEC y disminuye número de células caliciformes
	miR-1290	Aumentado en ACD	Modifica Ciclo celular aumentando la proliferación celular
	miR-31-5p	Disminuido en ACD	Suprime la acción del HIF1a durante hipoxia y de FOXP3 en Tregs
	miR-192-3p	Disminuido en ACD	Inhibe autofagia
	miR-194-5p	Disminuido en ACD con anemia	Inhibe la transición Epitelio/mesenquimal
	miR-638	Aumentado en ACD con anemia	Inhibe la vía Wnt/b-catenina

	miR-192-5p	Disminuido en ACD	Induce apoptosis de cardiomiocitos en condiciones de hipoxia
	miR-338-3	Disminuido en ACD	Suprime la proliferación e induce apoptosis de células de cáncer de pulmón
	miR-197	Disminuido en ACD	Inhibe la vía IL-6/STAT-3, inhibe Células T citotóxicas
ARNlnc	lnc-13	Disminuido en ACD y CD en DLG	Inhibe la producción de genes proinflamatorios (ej.: IFNG).

Tabla 4- Epigenética asociada a EC. miR-: Micro-RNA, y lnc-: ARN largo no codificante (Capuano *et al.*, 2011; Magni *et al.*, 2014; Castellanos-Rubio *et al.*, 2016).

Entre los diferentes ARNlnc, se destaca el lnc-13, cuya asociación con la EC fue descrita por Castellanos Rubio y col. (Castellanos-Rubio *et al.*, 2016). Este factor es un tipo de ARNlnc, cuya bioactividad suprime la expresión de diferentes genes proinflamatorios, entre ellos el *IFNG*. Asimismo, en esta investigación no solo asoció dicho factor con la EC, sino que demostró su expresión está disminuida en pacientes EC. A parte del lnc-13, ciertas publicaciones recientes sugieren otros ARNlnc asociados a la EC (Olazagoitia-Garmendia, Sebastian-delaCruz and Castellanos-Rubio, 2021).

Como anticipamos en los párrafos anteriores, la mayoría de los factores genéticos mencionados se asocian con diferentes eventos que afectarían al sistema inmune de mucosas. Una forma sencilla y reduccionista de visualizar dicha asociación se encuentra representada en la **Figura 3**, donde se destacan una serie de eventos numerados que se relacionan con distintos factores genéticos. Como se ve en esta figura, y se menciona en las tablas anteriores, varios puntos clave en la producción de la respuesta inmune adaptativa contra antígenos dietarios son blanco de los diferentes factores genéticos asociados a la EC. Entre ellos, debemos destacar el pasaje de antígenos por la barrera epitelial y endotelial facilitados por la disrupción de las uniones estrechas (**punto 1**). Otros genes se asocian con la presentación antigénica de péptidos derivados de gliadinas (**punto 2**, ej: HLA-DQA1/DQB1) y la producción de perfiles T proinflamatorios (**punto 3**). A parte, otros factores potencian la producción de inmunoglobulinas (**punto 4**). Finalmente, se destacan los factores genéticos asociados a la producción de una respuesta inflamatoria a cargo de células de la inmunidad innata, adaptativa y estromales (**puntos 5-9**). A pesar de esto, debemos tener en cuenta que la asociación de cada uno de estos genes con la EC es diferente, como también lo es su relevancia en la patogenia. No obstante, es claro que la mayoría de estos factores asociados a la EC indican una mayor propensión en los pacientes celíacos a generar respuestas inflamatorias, y en particular, a responder específicamente contra péptidos derivados del gluten.

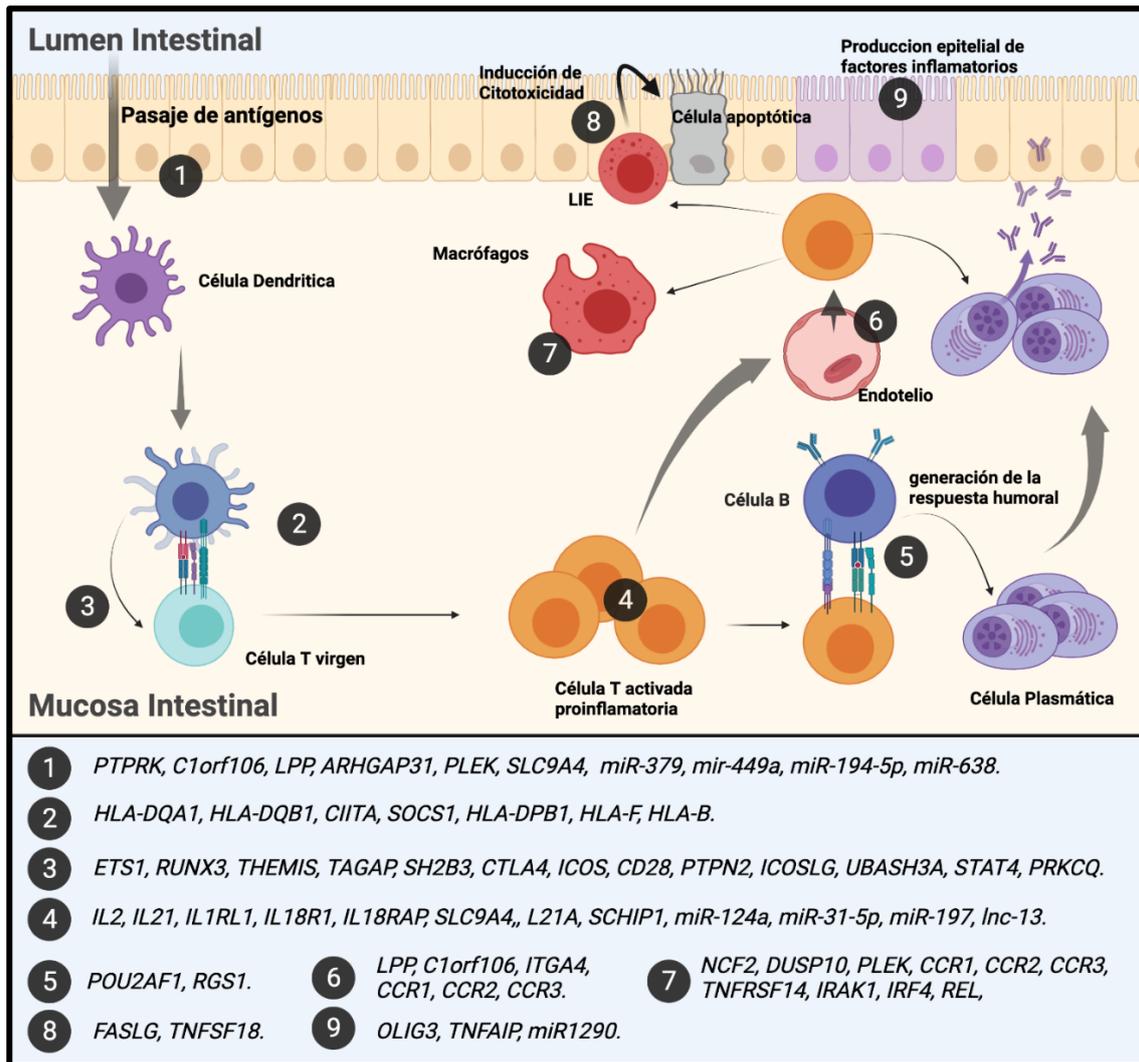


Figura 3-Infografía de los factores genéticos asociados a la EC y su posible impacto en el sistema inmune de mucosas. En la imagen se indica un esquema del lumen y la mucosa intestinal delimitada por el epitelio. Los puntos numerados indican diferentes procesos asociables a factores genéticos de predisposición a la EC. **(1)** Pasaje de antígenos desde el lumen intestinal al interior de la mucosa intestinal. **(2)** Carga y presentación de antígenos fagocitados por células presentadoras de antígenos a células T vírgenes. **(3)** Activación de las células T vírgenes restringidas a los alelos de susceptibilidad HLA. **(4)** Diferenciación y proliferación de las células T activadas. **(5)** Generación de una respuesta humoral por células B y diferenciación en células plasmáticas. **(6)** Migración de leucocitos a través del endotelio. **(7)** Activación y promoción de perfiles inflamatorios en células de sistema inmune innato. **(8)** Promoción de citotoxicidad celular dirigida por LIEs. **(9)** Promoción de producción estromal y epitelial de factores proinflamatorios.

1.5.2 Factores ambientales

Dentro de los factores ambientales se encuentran al menos cuatro que han sido estudiados como potenciales desencadenantes de la enfermedad, o participantes del proceso:

1. Características intrínsecas del gluten.
2. Disbiosis de la microbiota intestinal.

3. Infecciones Virales.
4. Cantidad de gluten, edad de introducción del gluten y duración de la lactancia materna.

1.5.2.1 Características intrínsecas del gluten

Para comprender los aspectos funcionales, y en especial las propiedades que relacionan a las proteínas del trigo con la patogenia de EC, es necesario describir brevemente sus características biofísicoquímicas tan particulares. Estas propiedades son fundamentales para entender cómo un sistema complejo de proteínas puede mantenerse estable durante la digestión intestinal y ocasionar diversos procesos de biológicos, inmunológicos y tóxicos.

El gluten es la masa o estructura viscoelástica que se forma luego de amasar con agua la harina de trigo. Luego de la remoción de la mayoría de los azúcares mediante el lavado con agua, el gluten contiene entre 75-85% de proteínas y un 5-10% de lípidos del peso seco final (Shewry and Halford, 2002; Wieser, 2007). Las propiedades del gluten para formar masa se deben principalmente a las proteínas (gliadinas y gluteninas) que confieren viscosidad, elasticidad y cohesividad. Estas proteínas interaccionan formando monómeros y complejos multimoleculares unidos por puentes disulfuro intercatenarios. Las gliadinas, y gluteninas, colectivamente denominadas prolaminas, tienen una composición de aminoácidos caracterizadas por abundantes prolina y glutamina, que le dan su nombre. Tradicionalmente, las proteínas de trigo se las clasifica de acuerdo con su solubilidad en etanol 60% v/v. La fracción de proteínas solubles son denominadas gliadinas, y la remanente insoluble, gluteninas. Las gliadinas a su vez se clasifican según la composición de aminoácidos, las secuencias repetitivas, y movilidad electroforética a pH ácido como: ω 5-, ω 1,2-, α/β - y γ -gliadinas. Las secuencias presentan en casi su totalidad motivos repetidos de prolina (P) y glutamina (Q). Estos aminoácidos representan entre el 26-16% (Prolina) y el 56-35% (Glutamina) del total. Por otro lado, las gluteninas son proteínas de que forman complejos por unión por puentes disulfuro de masa muy elevada, y de muy baja solubilidad en solventes alcohólicos acuosos. Para su disolución es necesario el uso de agentes reductores y desnaturalizantes (Shewry and Halford, 2002; Wieser, 2007).

La secuencia tan especial de estas proteínas con regiones repetitivas con abundantes prolina y glutamina hace que sean difícilmente digeridas por las enzimas del tracto gastrointestinal. Esto se explica porque el ser humano carece de enzimas proteolíticas con actividad prolil-endopeptidasa, y como consecuencia quedan péptidos largos en el lumen intestinal (Shan *et al.*, 2002, 2005; Ferranti *et al.*, 2007). A pesar de ello, estudios recientes, que se comentarán luego, sugieren que la microbiota podría aportar enzimas que contribuirían a la digestión de los fragmentos remanentes.

Entre las decenas de fragmentos proteicos reportados como productos de la digestión incompleta de α -gliadinas por enzimas gástricas (pepsina), duodenales (enzimas de borde en cepillo) y pancreáticas (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa A y B, elastasa), se mencionan a dos péptidos: el 33-mer y el p31-55.

- Péptido 33-mer: “LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF”.
- Péptido 31-55: “LGQQQPFPQPYPQPQPFPSQQPY”.

Estos péptidos han sido muy estudiados dado su capacidad de inducir diferentes procesos en la respuesta inmune, que permiten comprender la patogenia de la EC.

A principios de la década del 2000, el 33-mer fue descrito como el péptido inmunogénico modelo al presentar seis epitopes solapados que podían ser reconocidos por linfocitos T aislados de pacientes celíacos y restringidos a las moléculas de HLA de susceptibilidad para EC (Qiao *et al.*, 2004).

Si bien, el 33-mer es el péptido más usado como modelo de la respuesta específica de linfocitos T, existen numerosos estudios que identificaron otros péptidos de gliadinas, gluteninas y de las proteínas homólogas en cebada y centeno que inducen respuesta de linfocitos T. Estudios *in vitro* y bioinformáticos permitieron definir diferentes secuencias incluso para cada uno de los diferentes alelos de susceptibilidad (Sollid *et al.*, 2019).

Como mencionamos, los péptidos derivados del gluten se unen a las moléculas de HLA de clase II DQ2.5/DQ8/DQ2.2, pero es de destacar que muchos de ellos pueden ser deamidados en glutaminas en posiciones selectivas por actividad de la enzima transglutaminasa 2 (TG2). Esta deamidación selectiva genera neo-epitopes T con una afinidad mayor por el hueco de presentación en HLA-DQ2/DQ8. Esto es relevante en la patogenia de la enfermedad ya que de esta forma los neo-epitopes tienen mayor capacidad de estimulación de los linfocitos T específicos (Molberg *et al.*, 1997; Iversen *et al.*, 2020).

Por otro lado, se destacan los estudios sobre péptidos que no son inductores de respuesta adaptativa. Entre ellos, se describe la secuencia p31-55 que se libera por tratamiento de las enzimas gastrointestinales y pancreáticas. Este, a su vez, comprende el fragmento p31-43 “LGQQQPFPQPYP”, que se genera por el tratamiento del p31-55 con las enzimas del ribete en cepillo (Gianfrani *et al.*, 2015).

A diferencia del 33-mer, el p31-43 no se une a las moléculas de HLA de susceptibilidad (Calvanese *et al.*, 2019; Falcigno *et al.*, 2020), y no se ha detectado un receptor en la membrana celular (Paolella *et al.*, 2018). Sin embargo, este péptido es capaz de mediar múltiples efectos proinflamatorios, y tóxicos en diferentes sistemas *in vitro* o *ex vivo* (Chirido *et al.*, 2021). Entre estos procesos, promueve el estrés de retículo (Caputo *et al.*, 2012), induce un incremento de Ca²⁺ intracitoplasmático (Caputo *et al.*, 2012), altera el sistema de transporte de vesículas (Barone *et al.*, 2010), induce la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos y células epiteliales (principalmente: IL-15, IFNs Tipo I e IL-1β) (Capozzi *et al.*, 2013; Nanayakkara *et al.*, 2018; Gómez Castro *et al.*, 2019). En particular, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo experimental en ratón donde la administración de una única dosis de p31-43 por vía intragástrica, es capaz de inducir una respuesta inflamatoria y daño en la mucosa de intestino delgado proximal, caracterizada por aumento del número de LIEs y reducción de la relación V/C (Araya *et al.*, 2016; Gómez Castro *et al.*, 2019). Este ha demostrado representar un buen modelo *in vivo* para estudiar los efectos generados por la respuesta innata inducida por péptidos de gliadinas (Ruera *et al.*, 2021).

1.5.2.2 Disbiosis de la microbiota intestinal

Otro de los factores ambientales que ha sido involucrado en la patogenia de la EC es la alteración en la microbiota intestinal (disbiosis). Particularmente, se ha descrito un desbalance entre poblaciones de bacterias Gram negativas en la mucosa duodenal de pacientes celíacos al diagnóstico. Además, se encontró significativamente disminuida la relación (*Lactobacillus+Bifidobacterium*)/ (*Bacteroides* + *E. coli*) en los pacientes celíacos activos (Nadal *et al.*, 2007). Dado que los grupos *Bacteroides* y *E. coli* se consideran potencialmente proinflamatorias, se pensó que la mucosa intestinal de los pacientes celíacos activos modificaría su microbiota como consecuencia del entorno inflamatorio en el duodeno y que, a su vez, la disbiosis mantendría el proceso

inflamatorio. Curiosamente, estudios recientes muestran que los portadores de los alelos HLA-DQ2.5 tienden a poseer una microbiota con abundantes bacterias asociadas a un rol proinflamatorio, como Firmicutes y Proteobacterias, con una reducción de las Actiniobacterias (*Bifidobacterias*) (Olivares *et al.*, 2015).

Otros factores, como los genes asociados a la EC, o el uso de antibióticos de amplio espectro frente a infecciones bacterianas, también son considerados como potenciales causales de la disbiosis (Canova *et al.*, 2014). Se ha confirmado que el uso de ciertos antibióticos genera una disminución de ciertas poblaciones de Bifidobacterias (*Bifidobacterium longum*) y aumento de las *Bacteroides fragilis* (Pozo Rubio *et al.*, 2013).

La disbiosis tendría la capacidad de amplificar respuestas inflamatorias locales por diversos mecanismos, algunos de los cuales se encuentran asociadas a la EC:

- Modificación de poblaciones de células inmunes pro-tolerogénicas (Tregs, Macrófagos IL-10⁺).
- Modificación de poblaciones de células inmunes pro-inflamatorias (Th1, Macrófagos M1, CTLs, LIEs).
- Alteración de la barrera epitelial.

Se conoce que ciertos desbalances se asocian al aumento de patobiontes en la microbiota duodenal de los pacientes celíacos activos. Entre las especies capaces de inducir respuestas proinflamatorias, se encuentran: *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. pasteurii* y *P. aeruginosa* (Caminero 2016, Sanchez 2013). Al mismo tiempo, ciertos Lactobacilos y Bifidobacterias, que se encuentran disminuidas en el intestino de los celíacos activos, son reconocidos como inductores de linfocitos T reguladores que controlan la producción de citoquinas proinflamatorias (Round and Mazmanian, 2009). Por otro lado, en la condición crónica de una enteropatía de largo desarrollo, los altos niveles de IFN γ y TNF α causan una alteración en la integridad de la barrera epitelial, que amplifica la respuesta inflamatoria, al aumentar el ingreso de microorganismos y componentes proinflamatorios, como LPS, flagelina, y otros MAMPS. Al mismo tiempo, esta situación se cree podría incrementar el ingreso de péptidos derivados del gluten potenciando la activación de los linfocitos T específicos.

Finalmente, debemos considerar la interacción gluten-microbiota. Como mencionamos, se han observado cambios en las poblaciones microbianas en duodeno de en pacientes celíacos, entre ellas una disminución de *Lactobacillus spp.* (Pisarello *et al.*, 2014). Dichas bacterias liberan proteasas capaces de digerir gran variedad de péptidos de gluten, como el 33-mer. Por otro lado, ciertas bacterias asociadas a la patología, como *P. aeruginosa*, son capaces de producir elastasas y otras enzimas que aumentan la liberación de fragmentos inmunogénicos del gluten, entre ellos el 33-mer. Experimentos *in vivo* han confirmado que la presencia de *P. aeruginosa* en el duodeno de ratones C57BL/6, permite no solo la generación de péptidos antigénicos derivados del gluten, sino también, acelera su translocación a la *lamina propria* (Caminero *et al.*, 2016). A su vez, estos experimentos confirmaron la capacidad de las bacterias tipo *Lactobacillus spp.*, en digerir dichos péptidos inmunogénicos en el lumen intestinal (Caminero *et al.*, 2016). Esta evidencia resalta la importancia de la interacción entre el gluten y la microbiota, y sugiere un rol iniciador y/o amplificador de la respuesta inflamatoria frente a los péptidos del gluten en los pacientes celíacos. Además, estas investigaciones abren la puerta al desarrollo de nuevos tratamientos basados en enzimas degradadores de gluten (glutenasas) derivadas

de *Lactobacillus*, así como también el empleo de este tipo de probióticos en los pacientes celíacos (Chander *et al.*, 2018).

1.5.2.3 Infecciones Virales

Varias evidencias indirectas señalan a las infecciones virales como uno de los principales factores desencadenantes del proceso inflamatorio en la EC. La primera asociación la planteó el Dr. Kagnoff cuando propuso una reacción de mimica molecular entre un adenovirus, prevalente en infecciones pediátricas subclínicas, y una secuencia de gliadinas (Kagnoff *et al.*, 1984). Estudios de prevalencia serológica mostraron una mayor tasa de infección con rotavirus en pacientes celíacos (Stene *et al.*, 2006), y estudios posteriores con virus de hepatitis C en poblaciones celíacas pediátricas (Ruggeri *et al.*, 2008; Casella *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista mecanístico, las evidencias más robustas se obtuvieron recientemente empleando modelos experimentales en ratón. Se observó que cepas de reovirus (como la T1L), que generan una infección persistente y se eliminan lentamente, conducen a una respuesta inflamatoria que exacerba la respuesta frente a antígenos administrados por vía oral, como ovoalbumina en ratones OT-II, o péptidos de gluten en animales DQ8 transgénicos (Bouziat *et al.*, 2017). Este estudio demostró la diferencia entre una respuesta anti-viral rápida para eliminar la infección, de aquella persistente, que es capaz de mantener una respuesta inflamatoria compuesta de citoquinas proinflamatorias (principalmente IFN tipo I). Estas citoquinas promueven la diferenciación de las células dendríticas hacia un perfil proinflamatorio, caracterizado por la expresión del factor IRF1. A su vez, estas células pueden captar, procesar y presentar péptidos derivados de proteínas presentes en el lumen, y tienen la propiedad de diferenciar linfocitos T hacia el perfil Th1. De esta forma, este modelo permite extrapolar la idea que las infecciones virales, en un entorno de susceptibilidad genética, contribuyen al desarrollo de la EC (Bouziat *et al.*, 2017), y especialmente que los IFNs Tipo I, participarían en el inicio su patogenia de EC (Abadie *et al.*, 2011). Existe también cierto paralelismo entre estos modelos y lo observado en EC, ya que los animales infectados que presentaban una pérdida de tolerancia al gluten también presentaban activación de la TG2, y presencia de procesos citotóxicos mediados por CTLs (Bouziat *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios clínicos retrospectivos no siempre demuestran una asociación entre infecciones virales y la aparición de la EC. Esto puede deberse a posibles interacciones entre microbiota—genética—infecciones virales, o a la coexistencia con infecciones asintomáticas que, aun así, puedan desencadenar la enfermedad (Bouziat *et al.*, 2017; Brown, Jabri and Dermody, 2018).

1.5.2.4 Cantidad de gluten, edad de introducción del gluten y duración de la lactancia materna

Desde hace varias décadas se conoce que la tolerancia a antígenos dietarios se desarrolla en los primeros meses y años de vida. Esto sugirió que la edad de introducción del gluten a la dieta del recién nacido podría estar vinculado con la pérdida de tolerancia (Ivarsson *et al.*, 2002; Aronsson *et al.*, 2015). Sin embargo, estudios recientes indican que la edad de introducción al gluten no aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad (Aronsson *et al.*, 2015), aunque sí sería importante la cantidad de gluten al momento de su introducción (Silano, Agostoni and Guandalini, 2010). Es así como, estudios a gran escala en diferentes poblaciones sugieren que la cantidad de gluten consumida es un factor fuertemente asociado a la prevalencia de EC (Abadie *et al.*, 2011).

Estudios de nuestro grupo mostraron que los péptidos de gliadinas pueden aparecer en la leche materna con escasa degradación y podrían ser estimuladores de la respuesta en la mucosa intestinal del lactante (Chirido *et al.*, 1998). La presencia de gliadinas en leche materna combina dos factores. Por un lado, el amamantamiento retrasa la introducción de la ingesta de gluten, y a su vez, la leche materna tiene un efecto regulatorio en la mucosa que podría promover la tolerancia frente a las gliadinas. Esto condujo a la hipótesis que la edad de finalización de la lactancia materna y la introducción al gluten pueden ser factores relevantes en el inicio de la EC (Silano, Agostoni and Guandalini, 2010). Sin embargo, estudios recientes no encontraron una relación entre estos factores y la prevalencia de EC (Aronsson *et al.*, 2015). A pesar de ello, la complejidad del estudio y el monitoreo detallado de la población, dificultan obtener resultados robustos que permitan clarificar la importancia de estos factores.

1.5.2.5 Resumen integrado de factores ambientales

En la **Figura 4** se representa la interacción entre los factores ambientales mencionados y la respuesta inmune de mucosas. En el **punto 1**, se esquematiza la importancia de la microbiota normal y factores dietarios que la mantienen, en la prevención de respuesta inflamatorias específicas contra péptidos derivados de la dieta. A pesar de ello, el incremento en el consumo total de gluten esquematizado en el **punto 2**, en conjunto con la disbiosis intestinal con presencia de bacterias como *P. aeuginosa* (**punto 3**), permitirán una mayor disponibilidad de péptidos inmunogénicos derivados de gluten, como el 33-mer o el p31-55 (p31-43). A su vez, los péptidos de gluten tóxicos (ej., p31-43), en conjunto con otros factores derivados de la propia disbiosis, o la presencia de ciertas infecciones virales intestinales (**punto 4**), ocasionaría un ambiente inflamatorio en diferentes células inmunes y estromales de la mucosa intestinal. Este ambiente sería capaz de polarizar a las células presentadoras de antígenos a un perfil proinflamatorio (**punto 6**). Asimismo, estos factores ambientales juntamente con factores genéticos promoverían respuestas adaptativas proinflamatorias en las células T específicas. Al mismo tiempo, los factores genéticos antes mencionados serían clave en la potenciación de diversos puntos de la respuesta inflamatoria (**Figura 3**) como: el pasaje de antígenos por la barrera epitelial y la especificidad de la respuesta contra péptidos derivados del gluten como el 33-mer, entre otros. Finalmente, el ambiente inflamatorio permitiría que factores como la TG2 se sobreexpresen en la mucosa intestinal y se incremente la respuesta adaptativa contra péptidos del gluten y contra la propia TG2.

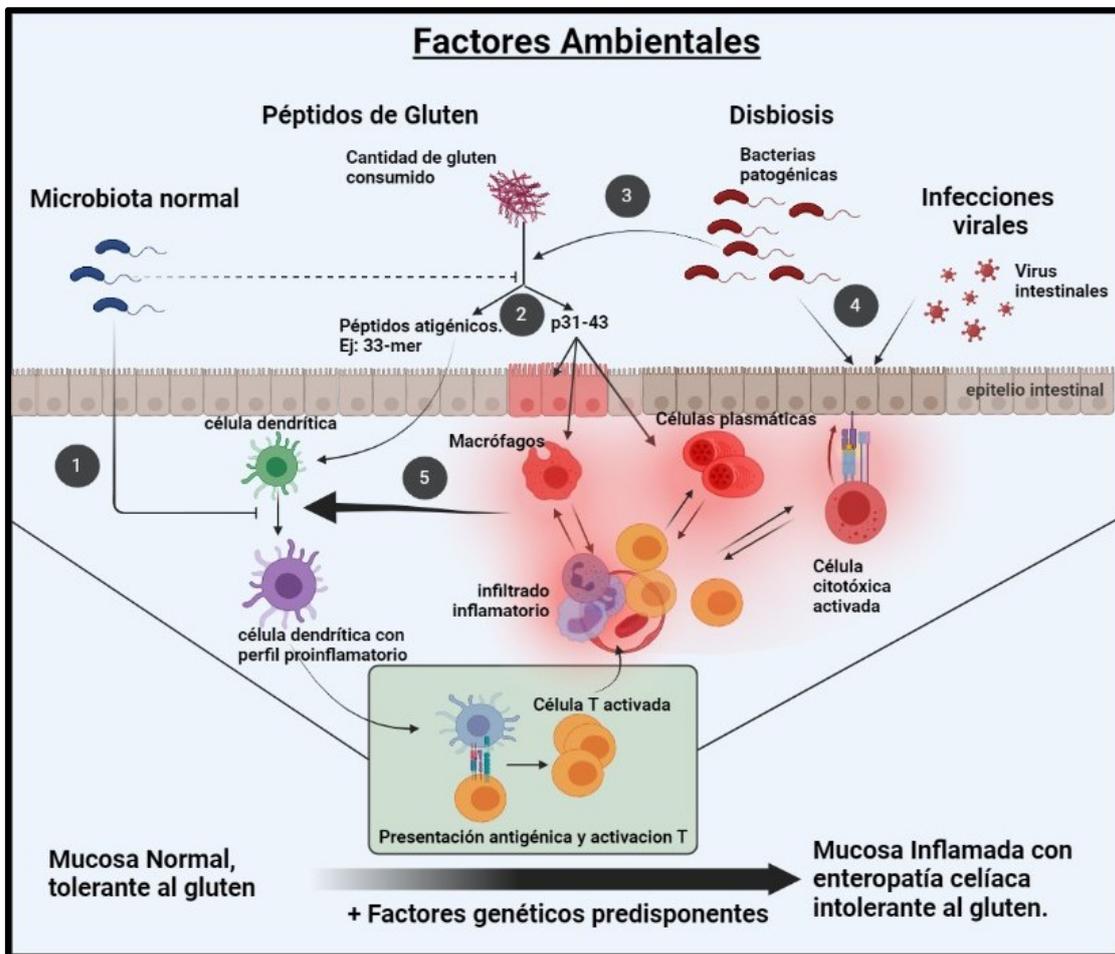


Figura 4- Factores ambientales asociados a la patogenicidad de la EC. Los puntos están discutidos en el texto de la sección 1.5.2.5.

Si bien lo mencionado es un modelo simple que se deriva de varios otros modelos *in vitro* e *in vivo* antes mencionados, es interesante contemplar la complejidad y la diversidad de factores que pueden intervenir en la pérdida de tolerancia al gluten en los pacientes celíacos y el desarrollo de la enteropatía intestinal característica.

En el **Anexo** se encuentra una formulación teórica del mecanismo de patogenicidad (**Modelo teórico de la patogenicidad de la Enfermedad Celíaca**), donde se describe en detalle los eventos probados y se debate sobre algunos de los puntos aún desconocidos de la patogenicidad de esta enfermedad.

1.6 Diferencias entre la enfermedad celíaca y otros desórdenes asociados al consumo de productos con gluten

Los desórdenes asociados al consumo de productos con gluten afectan distintas poblaciones alrededor del mundo, con una prevalencia total difícil de calcular (Lionetti *et al.*, 2015). A pesar de esto, se acepta que el 1% de la población presenta enfermedad celíaca, el 0.2-0.4% por la alergia al trigo y una proporción variable y difícil de definir, presenta la Sensibilidad al gluten no celíaca (Venter *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2012; Leonard and Vasagar, 2014; Catassi *et al.*, 2015; Lionetti *et al.*, 2015). En las siguientes

subsecciones se describen brevemente la alergia al trigo y la sensibilidad al gluten no celiaca en especial destacando las diferencias con la EC.

1.6.1 Alergia al Trigo

A diferencia de la EC, el mecanismo patogénico de la alergia al trigo se basa en una hipersensibilidad de tipo I con presencia de anticuerpos IgE de alta afinidad contra componentes derivados de la harina de trigo (Czaja-Bulsa and Bulsa, 2017). Su epidemiología es muy variable, con una presentación principalmente en niños, con síntomas intestinales como diarrea, vómitos entre 10 minutos a 4 horas posterior al consumo de alimentos con harina de trigo. En la mayoría de los casos, la alergia suele progresar hacia la tolerancia al trigo a la edad de 8-10 años (Czaja-Bulsa and Bulsa, 2017). En la población adolescente y adulta, los síntomas son más graves con predominancia de reacciones anafilácticas y presentaciones dérmicas y respiratorias (Czaja-Bulsa and Bulsa, 2017).

Existen diferentes antígenos que originan la respuesta alérgica mediada por IgE. Entre ellos, los más estudiados son ω 5-gliadina y la proteína de transporte de lípidos no específica (nsLTP), aunque se detectan también otras reactividades. Por lo que, en muchos casos, las pruebas de IgE específica no presentan buena relevancia diagnóstica (Czaja-Bulsa and Bulsa, 2017, 2018). Por todo ello, el diagnóstico clínico de esta enfermedad se basa en pruebas cutáneas con antígenos derivados de extractos de harina de trigo, y positividad a IgE específica contra ω 5-gliadina y el nsLTP. Aunque en la mayoría de los casos, el diagnóstico se basa en la evidencia clínica de ausencia de síntomas al excluir el trigo de la dieta (Czaja-Bulsa and Bulsa, 2018).

1.6.2 Sensibilidad al gluten no celiaca (NCGS)

Esta entidad clínica es considerada de difícil diagnóstico pues se trata de un síndrome con presentaciones intestinales y sistémicas, que revierten cuando el paciente sigue una dieta estricta libre de gluten, pero cuyo mecanismo de patogenia se desconoce. La sintomatología se caracteriza por presentación intestinal con diarrea, dolor y distensión abdominal. Los síntomas extraintestinales incluyen: aftas bucales, dermatitis, dolor en las articulaciones, ataxia, neuropatías periféricas, y depresión. El diagnóstico de NCGS se realiza por exclusión de EC y alergia al trigo (Catassi *et al.*, 2015). La dificultad e incertidumbre en el diagnóstico dificulta establecer la prevalencia de esta condición.

A diferencia de la EC, la NCGS no está asociada a HLA, y los pacientes solo presentan anticuerpos anti-gliadinas de isotipo IgG con ausencia de atrofia vellositaria (Casella *et al.*, 2018). Aunque se desconoce su patogenia, existe un consenso que se trata de una condición inflamatoria basada en mecanismos de la inmunidad innata desencadenada por componentes de la harina de trigo como gliadinas, los inhibidores de amilasa- tripsina (ATI) (Junker *et al.*, 2012), o por mezclas de azúcares simples y oligosacáridos (FODMAPs) presentes en la harina de trigo y de otros cereales (Priyanka, Gayam and Kupec, 2018).

En algunos artículos se describe que las muestras de biopsia duodenal presentan “enteritis microscópica” (Casella *et al.*, 2018), con un leve incremento de LIEs y de linfocitos T en la mucosa (Marsh, Villanacci and Srivastava, 2015), y en algunos casos, también se mencionan infiltrados de eosinófilos en la *lamina propria* (Carroccio *et al.*, 2012). La falta de marcadores diagnósticos, y evidencia histológica clara conduce a pensar esta condición como un síndrome complejo con solapamiento con otras entidades como el

síndrome de colon irritable (Casella *et al.*, 2018) o intolerancias alimentarias no identificadas (Carroccio *et al.*, 2012).

1.7 Modelos experimentales utilizados en el estudio de diversos aspectos de la enfermedad celíaca

Con el objetivo comprender la patogenia de la EC y el desarrollo de terapias farmacológicas, pre- o probióticas, se han utilizado diversos modelos experimentales incluyendo ensayos *in-vitro*, *in-vivo* y *ex-vivo*. La mayoría de estos modelos están listados y referenciados en la **Tabla 5**. Dentro de los modelos *in vitro*, se encuentran los modelos que estudian aspectos definidos en líneas celulares o células aisladas de pacientes celíacos. Si bien la información que generan estos modelos es limitada, han sido útiles en la comprensión de la enfermedad. En particular, han contribuido en la comprensión de la importancia de la presentación en los HLA-DQ2.5/8, el efecto de dosis de estas variantes y la respuesta inmune. Además, han permitido comprender diferentes aspectos relacionados con células no inmunes, como la función de la barrera epitelial en la regulación de la inflamación local y el pasaje de péptidos a la *lamina propria*. Por otro lado, se emplearon modelos *ex vivo*, que consisten en el cultivo de explantos de tejido duodenal de pacientes celíacos obtenidos por biopsia. Estos explantos se pueden cultivar con extractos de proteínas de gluten pre-digeridos, u otros estímulos. Estos modelos son muy completos en cuanto a la variedad de células presentes en el tejido estimulado, y han sido útiles para el estudio de la respuesta a los péptidos derivados de gluten en el tejido, análisis de citoquinas liberadas y el clonado de linfocitos T específicos, así como caracterizar la respuesta inmune local.

Finalmente, los modelos animales o *in vivo*, son muy variados e implican diferentes especies de animales. Sin embargo, los más desarrollados emplean ratones con modificaciones genéticas puntuales. Entre estos, destacamos el uso de ratones C57BL/6 transgénicos para la molécula HLA-DQ8. Estos ratones han permitido la comprensión del rol de diferentes factores en la inflamación intestinal y la respuesta inmune, ya sea innata o adaptativa, en el desarrollo de la EC. En estos modelos, se han podido evaluar: componentes de la microbiota y los productos derivados de la misma, agentes virales en el desarrollo de inflamación intestinal, péptidos derivados de gluten o metabolitos puntuales. Finalmente, debemos destacar que el modelo que se basa en el uso de ratones C57BL/6 transgénicos: HLA-DQ8-Dd-villin-IL-15tg, es uno de los más completos, en cuanto a la capacidad de reproducir diferentes aspectos de la patogenia como: la atrofia vellositaria y el infiltrado de linfocitos T en epitelio y *lamina propria* de intestino delgado de los ratones alimentados con una dieta rica en gluten. La enteropatía es limitada a la administración de gluten, y se encuentra respuesta celular y humoral contra péptidos de gluten y contra la enzima TG2. Por lo tanto, este modelo puede ser utilizado para indagar sobre posibles intervenciones terapéuticas en EC (Abadie *et al.*, 2020).

Tipo de Modelo	Subclase/descripción	Aspecto de la enfermedad a modelar	Comentarios	Referencias
<i>in vitro</i>	líneas celulares tumorales de epitelio intestinal: Caco2, IEC6, T84, HT29	Permeabilidad epitelial. Reorganización de citoesqueleto. Inducción de apoptosis. producción de citoquinas: IL-15, IL-1 β , TNF α .	La incubación de péptidos derivados de gliadinas (PT-gliadinas, p31-43) induce cambios en las células epiteliales asociados a la enfermedad	(Clemente <i>et al.</i> , 2003; Zimmer <i>et al.</i> , 2010; Maglio <i>et al.</i> , 2011; Reinke <i>et al.</i> , 2011; Caputo <i>et al.</i> , 2012)
<i>in vitro</i>	Caco2	Efecto de la microbiota proinflamatoria	Ciertas especies de bacterias (<i>B. fragilis</i>), asociadas a la EC, promueve respuesta inflamatoria en células epiteliales	(Sánchez, Laparra and Sanz, 2012)
<i>in vitro</i>	Células dendríticas derivadas de monocitos de pacientes celíacos	Migración a favor de gradiente de quimocinas. Producción de citoquinas (IL-8, TNF α)	Los péptidos de gluten estimulan a las células dendríticas a migrar más eficientemente a favor del gradiente de CCL19/21, y promueven su activación.	(Palová-Jelínková <i>et al.</i> , 2005; Harris, Fasano and Mann, 2010; De Palma <i>et al.</i> , 2012)
<i>in vitro</i>	Linfocitos T y presentadoras de antígenos aislados de pacientes celíacos	Efecto de los haplotipos asociados de HLA DQ2.5/8 en EC. Clones T específicos de péptidos de gluten, reconocimiento de epitopes de gliadinas	Estudio de los genes HLA en EC, diferenciación de linfocitos T (Th1, Th17)	(Lundin <i>et al.</i> , 1993; Hamilton <i>et al.</i> , 2002; Camarca <i>et al.</i> , 2009)
<i>ex vivo</i>	Cultivo de Biopsias de pacientes celíacos	Inhibición de Tregs por señal de IL-15. Asociación de citoquinas producidas con respuestas adaptativas (Th1, Th17). Reactividad de la mucosa duodenal celíaca a diferentes tipos de cereales	Modulación de la respuesta innata e interacciones entre células de la mucosa duodenal de pacientes celíacos.	(Maglio <i>et al.</i> , 2011; Zanzi <i>et al.</i> , 2011)
<i>in vivo</i>	inducido, cepas de bacteria de <i>P. aeruginosa</i> , o de enzimas provenientes de esta bacteria en ratones C57BL/6	Inflamación intestinal por presencia de bacterias aisladas de pacientes celíacos o sus subproductos	La bacteria <i>P. aeruginosa</i> induce, mediante su colonización y liberación de enzimas tipo elastasa (LasB), inflamación intestinal.	(Caminero <i>et al.</i> , 2016; Caminero, Meisel, <i>et al.</i> , 2019)
<i>in vivo</i>	inducido, desafío oral p31-43 ratones C57BL/6	enteropatía (Relación V/C, aumento de LIEs) inducción de la vía de IFNs por péptido derivado de gliadina	El péptido p31-43 induce enteropatía leve caracterizada por incremento de IFN γ , IFN β , IL-1 β , aumento de LIEs y reducción de la relación V/C.	(Araya <i>et al.</i> , 2016; Gómez Castro <i>et al.</i> , 2019)
<i>in vivo</i>	inducido, infección con Rotavirus T1L en C57BL/6	Perdida de tolerancia oral a péptidos derivados de alimentos (OVA)	La infección intestinal con la cepa T1L de rotavirus induce una pérdida de tolerancia a ovoalbúmina.	(Bouziat <i>et al.</i> , 2017)
<i>in vivo</i>	espontáneo, perro	enteropatía debido al consumo de gluten	La enteropatía no está asociada a un haplotipo MHC II	(Garden <i>et al.</i> , 2000)

<i>in vivo</i>	espontáneo, primate (Rhesus)	Modelo de sensibilidad al gluten en primates	Desarrollan enteropatía no dependiente de MHC II, y en otros casos dermatitis, pero sin enteropatía.	(Bethune <i>et al.</i> , 2008)
<i>in vivo</i>	Transgénico, cepas de bacteria de <i>P. aeruginosa</i> , o de enzimas provenientes de esta bacteria en ratones C57BL/6 transgénico para DQ8	Inflamación intestinal por presencia de bacterias aisladas de pacientes celíacos o sus subproductos en ratones transgénicos para el HLA DQ8	La bacteria <i>P. aeruginosa</i> induce, mediante su colonización y liberación de enzimas tipo elastasa (LasB), inflamación intestinal severa.	(Caminero, McCarville, <i>et al.</i> , 2019)
<i>in vivo</i>	espontáneo, Ratas Wistar AVN	enteropatía (disminución de la relación V/C y aumento de LIEs) debido al consumo de gluten	Las ratas recién nacidas de madre en dieta libre de gluten desarrollan enteropatía al consumir gluten en los primeros días de vida.	(Stepankova <i>et al.</i> , 1996)
<i>in vivo</i>	Transgénico, microbiota en ratones C57BL/6 transgénicos para la HLA-DQ8 infectados con rotavirus T1L	Perdida de tolerancia oral al gluten post infección con rotavirus	Modelo que apoya la teoría de un posible inicio de la EC por infecciones virales intestinales.	(Bouziat <i>et al.</i> , 2017)
<i>in vivo</i>	Transgénico, Ratones DQ8-Dd-villin-IL-15tg	enteropatía con formación de respuesta adaptativa contra el gluten.	Implica un modelo de triple transgénico, para el MHC DQ8, e IL-15 en células epiteliales y células de <i>lamina propria</i> . Reproduce la enteropatía con atrofia vellositaria e infiltrado en epitelio y <i>lamina propria</i> , respuesta inmune celular y humoral contra péptidos de gluten y TG2.	(Abadie <i>et al.</i> , 2020)

Tabla 5- Modelos experimentales utilizados para el estudio de la enfermedad celíaca.

1.8 Hipótesis general

Los mecanismos involucrados en el daño intestinal característico de la enteropatía celíaca están conformados por vías inflamatorias con participación fundamental de los interferones. Estas señales inflamatorias generan, mediante estrés y daño celular, la liberación de alarminas al medio extracelular que exacerban el mecanismo inflamatorio. Además, los mecanismos de regulación del sistema inmune a cargo de los componentes del eje TAM se encuentran afectados en su función inhibitoria de las señales inflamatorias en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos.

1.9 Objetivos de la tesis

1.9.1 Objetivo General

En la patogenia de la EC se considera que la respuesta inflamatoria local en el intestino delgado de los pacientes celíacos que consumen gluten facilitaría la pérdida de tolerancia y la generación de una respuesta celular específica contra péptidos derivados de gluten que conduce al daño histológico en la mucosa intestinal. Dichos fenómenos se creen ocasionados por la interacción entre factores genéticos y ambientales. En el **Modelo teórico de la patogenia de la Enfermedad Celíaca**, se discute en detalle un modelo teórico de los mecanismos de la patogenia de EC.

Entre los mecanismos de daño en la mucosa intestinal consideramos relevante el estudio de los factores inflamatorios que inician el daño, ya sea directo o a través de mecanismos citotóxicos, los mediadores liberados por el daño celular y los mecanismos de regulación del sistema inmune.

En este trabajo nos enfocamos en tres grupos de vías asociadas a la promoción o control de la respuesta inflamatoria, que se describen en tres partes.

- Parte A: Las alarminas: IL-33, HMGB1 e IL-1 α .
- Parte B: Los mediadores inflamatorios: Interferones tipo I, II, y III, y la vía IL-17 α /IL-21.
- Parte C: El sistema TAM-Proteína-S/Gas6.

Todos los estudios se realizaron sobre material biológico de pacientes que se encuentran en diagnóstico y eventualmente se emplearon modelos de enteropatía desarrollados en animales de experimentación.

1.9.2 Objetivos específicos de la parte A

En las últimas décadas diferentes investigaciones han logrado describir la existencia de moléculas endógenas que se liberan frente a situaciones de daño y estrés celular. El conjunto de estas señales se denomina alarminas, las que una vez liberadas al medio extracelular tienen la capacidad de activar diferentes células del sistema inmune para promover respuestas inflamatorias y de reparación tisular (Bianchi, 2007; Rider *et al.*, 2017). Si consideramos los diferentes factores ambientales asociados a la EC, las alarminas resultan interesantes ya que pueden ser liberadas por señales inflamatorias (IFNs, TNF α , entre otros), infecciones virales, y disbiosis de la microbiota intestinal (Rider *et al.*, 2017; Zhen *et al.*, 2017; Sarhan *et al.*, 2018).

Dentro del amplio grupo de alarminas, nuestro interés es estudiar a la IL-33 y su receptor ST2, que en conjunto conforman el eje IL-33/ST2. Esta vía es interesante en el contexto

de la EC, dado que IL-33 es liberada en situaciones de estrés celular y particularmente por muerte celular proinflamatoria. Una vez liberada esta citoquina puede tener una gran variedad de actividades desde proinflamatorias hasta pro-tolerogénicas dependiendo de las células y factores inflamatorios circundantes (Molofsky, Savage and Locksley, 2015; Martin and Martin, 2016). En particular, su liberación se encuentra asociada a la promoción de respuestas citotóxicas (Yang *et al.*, 2011).

Por otra parte, también estudiamos otros dos ejes de alarminas, HMGB1 e IL-1 α . Ambas proteínas son alarminas expresadas en condiciones homeostáticas por una gran cantidad de células. Al igual que IL-33, ciertos factores inflamatorios como IFNs o TNF α , pueden ocasionar su liberación al medio extracelular mediante muerte celular proinflamatoria (Sarhan *et al.*, 2018), o mediante vías vesiculares (Kim *et al.*, 2020). Una vez liberadas, HMGB1 e IL-1 α pueden provocar respuestas inflamatorias locales diversas con inducción de liberación de factores inflamatorios desde células estromales, epiteliales y de la inmunidad innata, e incluso potenciar respuestas Tipo 1 (Messmer *et al.*, 2004; Rovere-Querini *et al.*, 2004; Di Paolo and Shayakhmetov, 2016).

Los mecanismos de daño histológico en la mucosa duodenal de pacientes celíacos son diversos y se asocian a diferentes factores inflamatorios ocasionados por la respuesta inmune frente a péptidos derivados de gluten. Estos mecanismos implican desde apoptosis celular, hasta posibles daños por muerte celular proinflamatoria (piroptosis y necroptosis) (Shalimar *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2019; Perez *et al.*, 2021). Por todo ello, nos interesó estudiar las alarminas en la mucosa duodenal humana, y en particular, si estos ejes de alarminas se asocian a la patogenia de la EC.

De esta forma, los objetivos específicos de la parte A son:

- Describir y analizar el eje IL-33/ST2 en la mucosa intestinal humana y en pacientes celíacos activos. Analizar las células involucradas en este eje y evaluar posibles roles en la patogenia de la enfermedad celíaca.
- Describir y analizar los ejes IL-1 α /IL-1R y HMGB1 en el intestino delgado de pacientes celíacos al diagnóstico y muestras de población control.

1.9.3 Objetivos específicos de la parte B

La vía de IFNs ha sido asociada a la EC, principalmente por la presencia de un predominio del perfil Th1 de las células T específicas de péptidos derivados de gluten (Nilsen *et al.*, 1998). A su vez, se ha observado un rol fundamental de los IFNs en la pérdida de tolerancia al gluten en modelos animales (Martín-Fontecha *et al.*, 2003; Bouziat *et al.*, 2017). También, se han descrito diferentes roles proinflamatorios de la vía de IFNs tipo I en la enfermedad (Monteleone *et al.*, 2001; Jarry *et al.*, 2017). De esta forma, tanto IFNs tipo I como tipo II han sido asociados a la EC; sin embargo, otra de las vías que comparte gran semejanza con estos dos IFNs, los IFNs tipo III, no han sido estudiados en pacientes celíacos.

Otra de las vías involucradas en la respuesta inflamatoria contra péptidos de gluten es la respuesta asociada al perfil Th17, en especial, las citoquinas IL-17A e IL-21 (Monteleone *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2011). Estas han sido estudiadas en EC, pero los resultados han mostrado observaciones contradictorias sobre la presencia, asociación y rol de las células en la patogenia de la EC (Bodd *et al.*, 2010; Leeuwen *et al.*, 2013). Por ende, como parte complementaria de la descripción de la respuesta inflamatoria en los pacientes

celíacos nos propusimos evaluar la expresión de las citoquinas asociadas al eje Th17 y las células que producen IL-17A e IL-21 en la mucosa de intestino delgado.

Por lo tanto, los objetivos específicos de la parte B son:

- Evaluar la expresión y actividad de los tres tipos de IFNs en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos activos y muestras de población control.
- Analizar la expresión de las citoquinas del eje Th17 (IL-17A, IL-21, IL-22 e IL-23A) y las células que las expresan IL17A e IL21 en la mucosa intestinal de pacientes celíacos activos y muestras de población control.

1.9.4 Objetivos específicos de la parte C

En esta parte de la tesis, nos enfocamos en un eje no estudiado en el intestino delgado, pero que posee roles importantes en distintos puntos de la respuesta inflamatoria. Este sistema se denomina TAM, por las iniciales de los receptores celulares que los conforman: Tyro3, Axl y Mertk. Además, este eje cuenta con dos ligandos: proteína S y Gas6 (Rothlin *et al.*, 2015).

Hasta el momento de inicio de la tesis no existían investigaciones sobre el rol de este eje en intestino delgado humano. Sin embargo, se encontraban evidencias de su rol regulador del sistema inmune en diferentes modelos experimentales. Entre ellos, tiene un rol inhibitorio de la activación y polarización inflamatoria de la respuesta T, inhibe el perfil inflamatorio de los macrófagos residentes en tejidos, y aporta un mecanismo fundamental para la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Rothlin *et al.*, 2015; Nassar, Tabib, Capucha, Mizraji, Nir and Pevsner-fischer, 2017). Además, se ha planteado un modelo que asocia la expresión de este eje con los IFN tipo I, por medio del cual el sistema TAM inhibiría la respuesta inflamatoria a estas proteínas (Rothlin *et al.*, 2007).

La EC presenta una patología donde el daño histológico causado por células citotóxicas, y la presencia de mediadores inflamatorios se asocia a un incremento de la muerte celular programada (Cheravsky *et al.*, 2002; Shalimar *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2021). Por ende, el estudio del eje TAM es fundamental para comprender si algunos de los mecanismos de regulación de las vías inflamatorias están presentes en la enteropatía celíaca.

Por todo ello, los objetivos específicos de la parte C son:

- Describir y analizar los componentes del eje TAM en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos y pacientes controles sanos.
- Evaluar las poblaciones celulares involucradas en este eje y la asociación con la enfermedad celíaca.
- Evaluar la asociación entre los IFNs y el sistema TAM en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos.

2 Anexo de la introducción

2.1 Modelo teórico de la patogenia de la Enfermedad Celíaca

2.1.1 Desarrollo de un modelo teórico de la patogenia de EC

La EC es una de las patologías de base inmune que se conocen con mayor detalle; sin embargo, existen etapas que no han sido comprobadas. En algunos casos se extrapolan mecanismos en función de ensayos *in vitro* (usando líneas celulares o células aisladas de pacientes celíacos), en otros casos la información se toma del conocimiento del sistema inmune de mucosa intestinal en ratón. Es por eso, que hemos desarrollado un modelo teórico poniendo de manifiesto los aspectos que han sido verificados y aquellos que, en la formulación de los mecanismos de patogenia, aún son especulativos.

2.1.2 Introducción al modelo de patogenia

Siendo la EC una patología crónica, y en la que no existe un modelo animal que reproduzca completamente las etapas de la patogenia, se propone un modelo en desarrollo que considera que existen eventos “iniciadores”, como también factores que son fundamentales en la progresión de la enfermedad. Este es el resultado de teorizar cómo diferentes factores genéticos y ambientales se concatenan en una serie de pasos sucesivos destacando nodos o puntos fundamentales para el desarrollo de la enfermedad. Varias de las etapas propuestas han sido bien documentadas, aunque todavía existen eventos que se desconocen. Esta concatenación se realiza basándose en los conocimientos de leyes y otros modelos de la inmunología y de la biología en general. La comprobación de las hipótesis derivadas del modelo mediante experimentos y evaluaciones en cohortes de pacientes ha dado cierta solidez teórica; no obstante, como todo modelo científico, no queda exento de posibles modificaciones a futuro.

En este caso se debe mencionar que el modelo aquí presentado ha sido formulado en base a diferentes publicaciones que describen la patogenia y se ha ido modificando a través de los años (Sollid, 2002; Abadie *et al.*, 2011; Sollid and Lundin, 2019).

2.1.3 Nodos del modelo

Los nodos son los factores o eventos claves para que ocurra el inicio o la progresión de la enfermedad. Debemos mencionar al menos 7 nodos:

1. Digestión parcial y diferencial del gluten en el lumen del tracto gastrointestinal.
2. Ingreso de los fragmentos de péptidos derivados de gluten al organismo.
3. Interacción de los fragmentos de gluten con células presentadoras de antígenos y contribución de células o factores del medioambiente tisular.
4. Presentación de antígenos y generación de la respuesta T y B específica a fragmentos de gluten en órganos linfoides secundarios
5. Migración de las células T CD4⁺ específicas para fragmentos del gluten a la mucosa intestinal. Activación de células inmunes y no inmunes comandadas por células T CD4⁺ específicas para fragmentos del gluten.
6. Fallo de la respuesta regulatoria.
7. Progresión de la enfermedad de forma crónica.

En la **Figura 5**, se ven representados los nodos del 1º al 6º en una infografía integradora. Cada uno de estos nodos son afectados por diferentes factores ambientales y genéticos descritos en la introducción de la tesis. Como tal, dichos factores pueden o no estar presentes en todos los individuos que hayan desarrollado la enfermedad, pero cuando lo

están, impulsan el mecanismo modelado hacia la aparición y/o progresión de la enfermedad.

En la siguiente sección se presentan para cada uno de los nodos del modelo, los enunciados de manera explícita y discusiones sobre éstos.

Normalmente este tipo de descripción no suele escribirse en las diferentes publicaciones científicas sobre la EC. Sin embargo, esta idea y su formato resulta integradora para lograr un mejor entendimiento del contexto bibliográfico relacionado con la patogenia de la EC.

2.1.4 Integración del modelo y factores predisponentes

A continuación, se describe cada uno de los nodos y se argumentan las causas de su importancia, como también se plantean diversas hipótesis no comprobadas:

2.1.4.1 Digestión parcial y diferencial del gluten en el lumen del tracto gastrointestinal de los pacientes celíacos

Enunciado: Los péptidos derivados de gluten llegan al lumen intestinal parcialmente digeridos conformando fragmentos superiores a los 10 aminoácidos. La digestión de estos fragmentos genera un remanente de péptidos inmunogénicos en el lumen intestinal.

Discusión: La digestión parcial del gluten en el tracto gastrointestinal permite obtener fragmentos peptídicos largos que pueden tener más 10 o 30 aminoácidos de longitud en el lumen del duodeno. Esto es debido a la escasez de enzimas con capacidad proilendopeptidasas tanto pancreáticas, orales, gástricas o presentes en el borde en cepillo de los enterocitos (Shan *et al.*, 2002). Sin embargo, hay que mencionar que existe un componente importante en la microbiota intestinal y oral, capaz de realizar una hidrólisis de péptidos potencialmente antigénicos (Caminero *et al.*, 2014; Caminero, Meisel, *et al.*, 2019). De esta forma, ciertas especies del género *Lactobacillus* (duodeno), *Streptococcus* (duodeno) y *Rothia* (cavidad oral y duodeno), cumplen este rol (Zamakhchari *et al.*, 2011; Caminero *et al.*, 2014). Investigaciones recientes indican que los pacientes celíacos activos presentan una menor proporción de estas bacterias en el duodeno y en la cavidad oral (Caminero *et al.*, 2014; Caminero, Meisel, *et al.*, 2019). Debido a esto, fragmentos de péptidos derivados del gluten pueden quedar en mayor concentración en el lumen de los pacientes celíacos activos que en individuos no celíacos. Otro factor que no siempre es considerado es la cantidad de gluten consumida por persona por peso en la ingesta. De esta forma, existen diferentes regiones del mundo, donde se ha confirmado que un mayor consumo de gluten correlaciona con una mayor propensión al desarrollo de EC (Abadie *et al.*, 2011). Esto se puede explicar, en parte, dado que una mayor cantidad de gluten se transforma en mayor cantidad de péptidos potencialmente antigénicos (ej: 33-mer) o proinflamatorios (ej: p31-55/31-43) en el lumen intestinal.

Por otro lado, se ha observado aumento de actividad “glutenásicas” en la materia fecal de los pacientes celíacos (Gutiérrez *et al.*, 2017; Caminero, McCarville, *et al.*, 2019; Caminero, Meisel, *et al.*, 2019). Este componente enzimático, podría provenir tanto de enzimas endógenas (elastasas: CEL4B, CEL2A y la carboxipeptidasa: CBPA1) (Gutiérrez *et al.*, 2017) o exógenas, liberadas por la microbiota (filum: *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*) (Caminero, McCarville, *et al.*, 2019). Sin embargo, este aumento de actividad proteolítica no sería un factor positivo. De hecho, la enzima elastasa con propiedad “glutenásicas” derivada de *Pseudomonas aeruginosa* (LasB), es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en la mucosa duodenal, por clivaje del receptor PAR2 presente en la membrana apical de los enterocitos intestinales (Caminero, McCarville, *et*

al., 2019). Por otro lado, las elastasas endógenas mencionadas, poseen capacidad para la digestión de péptidos de gluten inmunogénicos en condiciones *in vitro*, pero no se ha demostrado su capacidad digestiva en el ambiente presente en el lumen del duodeno. Además, se ha confirmado que, en condiciones *in vitro*, ciertos componentes de la materia fecal de pacientes celíacos disminuyen la eficacia de las enzimas glutenásicas (Gutiérrez *et al.*, 2017). Entre estos factores inhibidores, se encuentran los inhibidores de α -amilasa/tripsina (ATIs) presentes en diferentes cereales y en péptidos derivados de la microbiota, entre otros menos estudiados (Cuccioloni *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2017).

Otro factor relevante es la predisposición genética, en especial la presencia de los alelos HLA-DQ2/DQ8. Aún en forma no esclarecida, la genética en cada individuo preselecciona parcialmente la composición de la microbiota, lo cual puede determinar la composición de enzimas glutenásicas en el lumen intestinal (Olivares *et al.*, 2015). Este efecto puede que sea potenciado por otros genes aún desconocidos, y por la interacción con factores dietarios como el mismo gluten, entre otros. Por todo esto, es necesario evaluar el rol de las enzimas glutenásicas en la predisposición a la EC.

2.1.4.2 Ingreso de los fragmentos de gluten al organismo.

Enunciado: Los fragmentos de gluten parcialmente digeridos traspasan la barrera epitelial para llegar a la *lamina propria*, o placas de Peyer.

Discusión: Para que se pueda producir una respuesta inmune de tipo adaptativa, se debe primero lograr que el antígeno llegue a las células presentadoras de antígenos presentes en los folículos de Peyer o en la *lamina propria* intestinal. Existen diferentes potenciales rutas de pasaje de los fragmentos de gluten desde el lumen intestinal hacia la *lamina propria*: Transporte paracelular, intracelular, mediado por células M, caliciformes, entre otras.

2.1.4.2.1 Transporte para-celular

Existen varias evidencias que demuestran que el transporte paracelular es clave en el pasaje de péptidos derivados de alimentos en el lumen intestinal. Este fenómeno se ha relacionado con problemas autoinmunes y alergias (Krug, Schulzke and Fromm, 2014). La cuestión reside en cuales son los mecanismos que permiten este pasaje. Los enterocitos presentan una gran variedad de proteínas en estructuras ordenadas, llamadas uniones estrechas. Estas uniones se disponen como en un cinturón alrededor de los mismos enterocitos y permite la unión entre células vecinas. Esta estructura crea una barrera física, de tipo mecánica, que evita el pasaje de moléculas, pero al mismo tiempo resulta ser permeable al agua y ciertos iones más pequeños en favor de su gradiente electroquímico. Desde hace varios años, se sabe que las proteínas que conforman dichas estructuras están desreguladas en los enterocitos de la mucosa duodenal de los pacientes celíacos. Esto se basa en la disminución de las claudinas 3, 5 y 7 (Schumann *et al.*, 2012, 2017), fundamentales en la formación de la barrera, y un aumento de las claudinas 2 y 15 que desestabilizan la barrera y son características de enfermedades con malabsorción intestinal (Ong *et al.*, 2020). También existe una disminución de la proteína ZO-1 fosforilada, fundamental en la estabilidad de las uniones estrechas (Ciccocioppo *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, se ha descrito que otras proteínas importantes en la reparación del epitelio durante eventos apoptóticos masivos, como E-cadherina se encontrarían disminuidas en el epitelio de pacientes celíacos no tratados. En parte, se piensa que esto se debe al efecto de citoquinas inflamatorias como IFN γ y TNF α (Ciccocioppo *et al.*, 2006; Kiesslich *et al.*, 2007; Lubkov and Bar-Sagi, 2014). Estos cambios estructurales conducen a la pérdida de

uniones estrechas funcionales (Schumann *et al.*, 2017) demostrada por una menor resistencia trans-epitelial en pacientes celíacos no tratados respecto a muestras de población control. La pérdida funcional en las uniones estrechas es parcialmente revertida mediante el consumo de una dieta libre de gluten (Schumann *et al.*, 2017). A parte, las citoquinas proinflamatorias $IFN\gamma$ y el $TNF\alpha$, que se encuentran sobrepresadas en EC, inducen aumento de la permeabilidad intestinal (Forsberg *et al.*, 2002; Feighery *et al.*, 2003) al desestabilizan otros componentes de la unión estrecha (Bruewer *et al.*, 2005; Al-Sadi *et al.*, 2010). También se postuló que la zonulina, incrementada en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos, podría estar involucrada en alterar las uniones estrechas (Tripathi *et al.*, 2009).

Es posible que en los pacientes celíacos también existan defectos genéticos en la formación de las uniones estrechas. En este sentido, estudios genéticos han identificado posibles genes asociados a EC que cumplen roles importantes en la estructura de las uniones estrechas. Entre estos, se mencionan MYO9B (Monsuur *et al.*, 2005), PARD3 y MAGI2 (Wapenaar *et al.*, 2008) y otros asociados a SNPs (**Figura 3**). Estas moléculas desempeñan roles muy importantes en la polarización de las células epiteliales, en la conformación de las uniones estrechas, como también en la reorganización de la F-actina en el citoesqueleto de los enterocitos (Schumann *et al.*, 2017).

Finalmente, se conoce que ciertos péptidos de gliadinas, como el p31-43, son capaces de afectar el transporte de vesículas apical de enterocitos, efecto que altera la estructuración de las uniones estrechas, y aumenta la permeabilidad paracelular (Barone and Zimmer, 2016). Por todo esto, se considera que el aumento de permeabilidad intestinal en los celíacos es un efecto consecuente a la participación tanto de factores ambientales, como también genéticos.

2.1.4.2.2 Transporte intracelular:

Normalmente, los enterocitos solo pueden absorber aminoácidos libres por medio de diferentes transportadores de membrana apical o péptidos cortos de hasta tres aminoácidos por medio del transportador PEPT-1 (Leibach and Ganapathy, 1996; Caminero *et al.*, 2014). En el caso especial de péptidos más largos, producto de la digestión parcial del gluten, se observa un pasaje selectivo de alta eficiencia por medio del receptor de transferrina (CD71). Este receptor es capaz de unir complejos inmunes IgA anti- gliadinas y mediar un transporte sin degradación proteolítica hacia la región basolateral de los enterocitos. En condiciones homeostáticas, el CD71 se localiza exclusivamente en la membrana basolateral de los enterocitos, pero en epitelio duodenal de pacientes celíacos no tratados se encuentra también en el borde apical (Matysiak-Budnik *et al.*, 2008). Se piensa que la alteración en la diferenciación y polarización de las células epiteliales, descritas en la sección anterior, puede estar relacionada con la localización aberrante de CD71 (Schumann *et al.*, 2017). De esta forma, los pacientes celíacos presentarían un mecanismo eficaz de transporte de péptidos de gluten desde el lumen a la *lamina propria*. No obstante, para que este mecanismo funcione deben encontrarse anticuerpos IgA anti-gliadinas preformados. Por lo tanto, éste podría ser un evento coadyuvante en la patogenia, pero no participaría en la inducción la misma (Abadie *et al.*, 2011). Sin embargo, debe tenerse presente que EC está asociada a déficit selectivo de IgA y, por lo tanto, la presencia de IgA anti-gliadinas no es un elemento indispensable en el desarrollo de la enfermedad.

2.1.4.2.3 Transporte por células caliciformes, células dendríticas y células M:

Recientemente se ha mostrado que las células caliciformes, además de secretar mucinas, participan en el transporte de péptidos presentes en el lumen (Kulkarni *et al.*, 2019). De esta forma, las células caliciformes toman péptidos del lumen mediante macropinocitosis y los transportan a la *lamina propria* donde pueden ser capturados por macrófagos. Este mecanismo podría tener participación en los eventos de inducción de respuesta regulatoria frente a proteínas de la dieta. Sin embargo, no hay ninguna evidencia que los péptidos derivados de gluten sigan esta vía. Por lo tanto, se espera que se desarrollen estudios para investigar este mecanismo en el caso de la EC.

El ingreso de péptidos provenientes del lumen intestinal también puede ocurrir por otras dos vías. En el primer caso, las protagonistas serían las células M. Estas células epiteliales que cubren las placas de Peyer presentan pobre desarrollo de microvellosidades y glucocálix, y son muy activas en macropinocitosis. Por lo tanto, son excelentes transportadoras de material presente en el lumen intestinal, sea microorganismos o macromoléculas (Gebert *et al.*, 2004). Por esta razón, las células M son fundamentales en la iniciación de respuestas adaptativas en la placa de Peyer dirigidas a componentes de la microbiota y antígenos alimentarios (Rios *et al.*, 2015). Este rol se debe a la capacidad de generar vesículas que transportan el material endocitado a la región del domo de la placa de Peyer, donde se encuentran células dendríticas que activan linfocitos T. Este mecanismo se ha visto en diferentes esquemas experimentales, pero no hay evidencia que ocurra transporte de péptidos de gluten en el caso de EC (Mulder and Mulder-Bos, 2006).

Finalmente, en el epitelio del intestino delgado se encuentra una población de macrófagos, caracterizados por la expresión del receptor de quimoquinas CX3CR1, que puede emitir prolongaciones o dendritas hacia el lumen, las que activamente podrían captar macromoléculas presentes en el lumen intestinal (Kelsall, 2019). Estas células pueden participar en el transporte de macromoléculas y microorganismos, y de esta forma cumplen un rol importante en la posterior inducción de respuesta específica. Sin embargo, su función crítica es la liberación de IL-10, generando un entorno pro-tolerogénico. Es así, que estas células puedan tener un rol relevante en el control de la respuesta inmune en la mucosa intestinal; sin embargo, no hay evidencia de su participación en la patogenia de EC.

2.1.4.3 Interacción de los fragmentos de gluten con células presentadoras de antígenos y contribuciones de células o factores del medioambiente tisular

Enunciado: Una vez que los péptidos derivados de gluten han atravesado la barrera epitelial, algunos son parcialmente deamidados por la enzima TG2. Estos péptidos, deamidados o no, son endocitados por células dendríticas que migran a órganos linfoides secundarios. El ambiente proinflamatorio en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos diferencia a las células dendríticas, que activarán y diferenciarán a los linfocitos a T hacia un perfil predominantemente Th1.

Discusión: Como ya se ha mencionado, la enzima TG2 tiene la capacidad de modificar residuos de aminoácidos presentes en la secuencia Glutamina-X-Prolina, transformando los residuos de glutamina en glutamato (Klöck, DiRaimondo and Khosla, 2012). Esta secuencia es muy frecuente en las prolaminas, lo que explica que gran cantidad de péptidos derivados de gluten sufran dicha modificación. Además, los pacientes celíacos presentan una mayor expresión y actividad enzimática de TG2 (Esposito *et al.*, 2003). Por

esto se piensa que una gran cantidad de péptidos derivados de gluten que traspasaron la barrera epitelial son modificados por esta enzima en *lamina propria* (Abadie *et al.*, 2011).

Estudios recientes indican que la actividad de TG2 podría observarse no sólo en la *lamina propria*, sino también en el lumen intestinal. Así, esta enzima podría ser liberada en el lumen por enterocitos extruidos del epitelio que sufren necrosis secundaria.

Debido a actividad de la TG2 los péptidos derivados de gluten serían deamidados y entrecruzados entre sí y con otras proteínas, como la propia TG2. De esta forma, se propone que estos péptidos modificados en el lumen intestinal podrían ser captados por células M en las placas de Peyer (Iversen *et al.*, 2020).

La deamidación de glutaminas por la TG2, es un evento central en la patogenia ya que la introducción de cargas negativas por el glutamato aumenta la afinidad de los péptidos derivados de gluten por las posiciones de anclaje en el hueco de presentación de los alelos de susceptibilidad HLA-DQ2/DQ8 (Sollid, 2002; Kim *et al.*, 2004). Por todo esto, la mayor actividad de la TG2 en la mucosa duodenal celíaca, o en el lumen intestinal, actúa como amplificador de la respuesta inmune adaptativa hacia los péptidos derivados del gluten.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el IFN γ tiene un rol importante en la actividad de la TG2 (Bayardo *et al.*, 2012). El aumento de la actividad de TG2, se basa en el aumento de su expresión y en el cambio conformacional hacia el estado activo (conformación abierta). Uno de los inductores de este cambio conformacional es tioredoxina (TRX), cuya liberación al medio extracelular desde varios tipos celulares es mediada por IFN γ (Jin *et al.*, 2011; Plugis *et al.*, 2017).

Por último, este enunciado considera que las células dendríticas son fuertemente afectadas por el ambiente inflamatorio. Esto deriva de varias investigaciones que demuestran que la mayoría de los antígenos dietarios presentados por una célula dendrítica en un contexto no inflamatorio, induce una respuesta tolerogénica (Commins, 2015). Sin embargo, la respuesta inmune en la mucosa duodenal de pacientes con EC activa se encuentran linfocitos T con perfil Th1, que conducen a una pérdida de tolerancia a péptidos derivados del gluten (Abadie *et al.*, 2011). De esta forma, se ha hipotetizado que las células dendríticas proinflamatorias son las células críticas en generar la respuesta T Th1. Existen numerosas publicaciones que apoyan esta hipótesis, y de hecho es aquí donde varios de los factores ambientales y genéticos discutidos han sido propuestos como iniciadores de la enfermedad. De esta forma, los altos niveles de IFN tipo I, observados en pacientes con EC activa (Monteleone *et al.*, 2001) inducidos por factores ambientales: infecciones virales (Bouziat *et al.*, 2017), disbiosis de la microbiota (Schaupp *et al.*, 2020), podrían modular el fenotipo de las células dendríticas. Dicho fenotipo es responsable de inducir un perfil Th1 de células T gluten-específicas (Bouziat *et al.*, 2017; Jarry *et al.*, 2017), así como células citotóxicas (Spadaro *et al.*, 2012; Schiavoni, Mattei and Gabriele, 2013). Por lo tanto, los IFNs, en particular los IFNs tipo I serían el principal factor direccionador de la respuesta proinflamatoria en EC (Abadie *et al.*, 2011). No obstante, también se sabe que los pacientes celíacos activan ciertas vías regulatorias demostradas por un aumento de poblaciones de células IDO⁺ (indoleamina 2,3-dioxigenasa) (Vorobjova, 2015), e incremento de TGF β (Hansson *et al.*, 2002) en pacientes con EC activa. Si bien ambas vías son promotoras de una respuesta tolerogénica, se desconoce si son capaces de generar poblaciones regulatorias en los pacientes celíacos activos. De esta forma, aunque las células dendríticas son actores centrales en la inducción de estos mecanismos, restan conocer aspectos moleculares sobre la influencia de las señales provistas por el entorno

en el rol de estas células en la respuesta inmune frente a péptidos derivados de gluten. Al mismo tiempo, el empleo de metodologías de análisis más potentes ha identificado nuevas subpoblaciones de células dendríticas, lo que permite una mayor comprensión de la funcionalidad de cada subtipo celular (Watchmaker *et al.*, 2014). Sin embargo, estas nuevas metodologías no han sido aplicados aún al estudio de la enfermedad celíaca.

2.1.4.4 *Presentación de antígenos y generación de la respuesta T y B específica a péptidos derivados de gluten en órganos linfoides secundarios*

Enunciado: Luego de endocitar péptidos derivados de gluten, las células dendríticas migran a los órganos linfoides secundarios (OLS) más cercanos. Es allí, donde se presentarán estos péptidos en el contexto de los HLA-DQ2/DQ8, y se activarán linfocitos T. La expansión clonal consecuente dará lugar a un conjunto de linfocitos T específicos contra péptidos del gluten. Entre los diferentes perfiles T, predominan los fenotipos: Th1, Th17, Tfh (en orden de relevancia en EC). Algunos linfocitos T contribuyen a la activación de linfocitos B que producen anticuerpos anti-gliadinas y otros anti-TG2. La capacidad de generar autoanticuerpos anti-TG2, se debe a la formación de complejos TG2-peptidos endocitados por células B autorreactivas contra la TG2, que serían activadas al presentar los péptidos del gluten en el contexto HLA-DQ2/8 por células T específicas de estos péptidos derivados del gluten.

Discusión: Parte de este enunciado no ha sido confirmado experimentalmente, sino que se deduce del funcionamiento del sistema inmune de mucosa intestinal basado en la información obtenida en modelos en ratón (Abadie *et al.*, 2011; Commins, 2015; Bouziat *et al.*, 2017). Esto es comprensible dado que no es posible contar con ganglios linfáticos drenantes de la mucosa intestinal de pacientes celíacos. Basándonos en la existencia de una respuesta inmune celular y humoral contra péptidos de gluten, el enunciado solo se conforma aplicando mecanismos generales. La evidencia vincula una exacerbada respuesta de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo Th1 específica a péptidos de gluten parcialmente digeridos presentados en el contexto de HLA-DQ2/8 (Nilsen *et al.*, 1998). No se menciona en el enunciado la presencia de una respuesta pro-tolerogénica contra estos antígenos. Sin embargo, lo más probable es que nos encontremos con un balance de células proinflamatorias y regulatorias contra estos péptidos. Al mismo tiempo, aún es difícil identificar linfocitos T específicas de péptidos de gluten con perfiles de tipo Tr1, Th2, Th17, y Tfh (Gianfrani *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2011; Sarra *et al.*, 2013; Christophersen *et al.*, 2019; Bakker *et al.*, 2021).

Paralelamente, se desconoce si la respuesta T por células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) puede inducirse en estos órganos. Esto se debe a que es reciente el hallazgo de HLA tipo I con capacidad de presentar péptidos de gluten (Kumar *et al.*, 2015; Picascia *et al.*, 2017). Además, se ha descrito el rol de las células citotóxicas como controladores de células con estrés biológico, particularmente enterocitos, efecto que puede contribuir a la pérdida masiva de células epiteliales (Jabri and Sollid, 2017).

Por otro lado, la existencia de células B y células plasmáticas productoras de anticuerpos tipo IgG e IgA contra péptidos derivados del gluten en un estado nativo o deamidados, ha sido extensamente documentada (Di Niro, Mesin, N. Y. Zheng, *et al.*, 2012; Mesin, Sollid and Di Niro, 2012; Du Pré and Sollid, 2015). No obstante, el mecanismo celular por el que estas células serían activadas no es completamente comprendido (Du Pré and Sollid, 2015). Se ha planteado que la activación de la TG2 tendría un rol importante en la inducción de la respuesta humoral inicial interactuando directamente con los receptores B (BCR) (Du Pré and Sollid, 2015). Más curioso e interesante es la existencia de

anticuerpos anti-TG2 sin haber encontrado evidencias de poblaciones de células T autorreactivas específicas para la TG2 (Mesin, Sollid and Di Niro, 2012; Du Pré and Sollid, 2015). Aunque no ha sido posible establecer la localización de TG2 catalíticamente activa, se ha demostrado que la TG2 es capaz de unirse a péptidos de gluten de forma covalente. La estructura resultante de esta reacción (TG2-gliadinas) sería unida por el BCR de linfocitos B autorreactivos específicos para TG2 y endocitados, para seguir la vía de presentación en HLA-DQ2/8. Los linfocitos T específicos de péptidos derivados de gluten reconocerían estos péptidos presentados en HLA-DQ2/DQ8 y mediarían señales de activación a las células B productoras de anticuerpos anti-TG2 (Abadie *et al.*, 2011; Du Pré and Sollid, 2015). También se ha propuesto que la TG2 es capaz de realizar enlaces cruzados entre los BCRs permitiendo la activación de las células B de manera independiente a la existencia de una célula T activadora (Du Pré and Sollid, 2015; Hnida *et al.*, 2016; Høydahl *et al.*, 2019). Se desconoce si estos mecanismos se llevan a cabo en los OLS drenantes de la mucosa intestinal de pacientes celíacos activos. De hecho, dado que tanto los anticuerpos anti-TG2 y los anti-gliadinas deamidadas presentan una baja tasa de hipermutación somática (Di Niro, Mesin, N.-Y. Zheng, *et al.*, 2012; Steinsbø *et al.*, 2014), se ha sugerido la posible inducción de las células productoras de estos anticuerpos fuera de los centros germinales de los OLS (MacLennan *et al.*, 2003).

2.1.4.5 Migración de las células T CD4⁺ específicas para fragmentos del gluten a la mucosa intestinal. Activación de células inmunes y no inmunes por células T CD4⁺ específicas para fragmentos del gluten

Enunciado: Las células T CD4⁺ activadas en los OLS, migran a la mucosa intestinal por medio de un conjunto de señales y receptores presentes en su membrana celular. Un vez en la mucosa intestinal, estas células se activarán si encuentran los epitopes T adecuados en el contexto de HLA al que están restringidos sus TCR. Luego de la activación, estas células liberarán grandes cantidades de citoquinas inflamatorias, principalmente IFN γ . La consecuencia a largo plazo de la exposición a fragmentos de gluten conlleva a la activación de vías inflamatorias en macrófagos, células dendríticas, mastocitos, monocitos, LIEs y células B y plasmáticas presentes en la mucosa. En un estado crónico, estas señales inflamatorias modifican los programas celulares de células mesenquimales, vasculares y epiteliales de la mucosa intestinal.

Discusión: Nuevamente este enunciado se basa en aplicar conocimientos generales de la respuesta inmune a datos experimentales. No obstante, si se ha demostrado que los pacientes celíacos presentan una población de células T CD4⁺ específicas de péptidos de gluten en sangre periférica o en la mucosa intestinal. Estas células expresan marcadores de localización en la mucosa intestinal, como la integrina $\alpha 4\beta 7$ (Anderson *et al.*, 2005). Dichas células se activan en forma específica frente a péptidos derivados de gluten, liberando IL-2, IFN γ , IL-21 y TNF α en grandes cantidades al medio extracelular (Mazzarella, 2015). Estas citoquinas, sumadas a otras en la mucosa intestinal celíaca (por ejemplo, IL-15 e IFNs tipo I), desencadenan eventos de activación celular fundamentales en la patogenia celíaca (Abadie *et al.*, 2011). También, se han propuestos nuevos ejes de citoquinas como adyuvantes de esta respuesta que incluyen a: IL-17A, IL-23A, IL-18, IL-1 β e IL-27, entre otros. Sin embargo, aunque su rol es menos explorado, parecen ser señales relevantes en la patología pudiendo activar: Mastocitos, Th17, LIEs IL-17A⁺, Neutrófilos, células mesenquimales, etc (Dunne *et al.*, 2020).

Se especula que el perfil tipo Th1 de las células T reactivas contra péptidos de gluten sería el encargado de llevar a cabo el daño tisular. Esto sería posible por la actividad biológica

de las citoquinas que este perfil de células T libera al medio (Mazzarella, 2015). El IFN γ mediador principal de este fenómeno, es capaz de afectar la permeabilidad intestinal (Bethune *et al.*, 2009), de inducir la expresión de HLA-DQ2/8 y moléculas coestimuladoras como CD80/86 en varias células presentadoras de antígenos (YOKOZEKI *et al.*, 1997). A su vez, esta citoquina es capaz de estimular la fagocitosis por macrófagos diferenciándolos a un perfil inflamatorio (M1). De esta manera, se amplifican los fenómenos mencionados de ingreso de péptidos de gluten y su consecuente presentación a las células Th1. Además, el IFN γ es capaz de estimular ciertas poblaciones de células citotóxicas, en particular las células NK (Nilsen *et al.*, 1998). Asimismo, el IFN γ induce la expresión de la HLA-E en enterocitos, molécula que participa en el eje de reconocimiento por linfocitos citotóxicos (Gustafson and Ginder, 1996; Jabri *et al.*, 2000). Dichos fenómenos se proponen como desencadenantes del daño exacerbado en el epitelio intestinal de los pacientes celíacos activos. Al mismo tiempo, el IFN γ es capaz de inducir quimoquinas como la CXCL10 en diferentes células, como: enterocitos, células vasculares y plasmáticas, capaces de activar y reclutar células citotóxicas y linfocitos Th1 que expresan su receptor, CXCR3 (Bondar *et al.*, 2014). Debemos mencionar que las células CD4⁺ Th1, no son las únicas productoras de IFN γ en los pacientes celíacos, sino que también los linfocitos T CD8⁺, células NKT y células NK lo producen (Mazzarella, 2015). Esto lleva a pensar que existe una interacción entre elementos de la inmunidad innata y adaptativa que desencadena la secreción de esta citoquina. Por otro lado, el IFN γ , en conjunto con otros factores como el TNF α e IL-1 β juegan un rol importante en la secreción aumentada de metaloproteinasas (MMPs) por fibroblastos de la *lamina propria* de pacientes celíacos (Ciccocioppo *et al.*, 2005). Estas MMPs, serían encargadas de degradar la matriz extracelular y promover un recambio epitelial acelerado.

Por otro lado, la IL-21 es una citoquina adyuvante en la activación de las propiedades citotóxicas y anti-apoptóticas de las NK y los CTLs, particularmente de los LIEs que se encuentran infiltrando el epitelio de los pacientes celíacos (Liu *et al.*, 2007; Fina *et al.*, 2008; Jabri and Sollid, 2017). Al mismo tiempo, la IL-21 también promueve la respuesta humoral al amplificar la expansión de células plasmáticas y de promover la secreción de anticuerpos (Ettinger *et al.*, 2005). Se ha demostrado que el bloqueo de la IL-21 en biopsias de pacientes celíacos disminuye los niveles de IFN γ y de T-bet. Este último es un factor nuclear clave en el desarrollo y mantenimiento de las células Th1, NK, y CTLs tipo 1 (Szabo *et al.*, 2000; Fina *et al.*, 2008; Mazzarella, 2015).

En cuanto a la citoquina IL-15 se la considera como un elemento crítico en la respuesta inmune en la EC. Se sabe que los niveles de IL-15 y del receptor IL-15Ra están significativamente aumentados en la enfermedad activa (Bernardo *et al.*, 2008). De hecho, IL-15 es principalmente inducida en el epitelio intestinal de los pacientes celíacos activos (Bernardo *et al.*, 2008) donde potencia la actividad citotóxica de los CTLs y células NK. Así, IL-15 induce la expresión de CD94 (Jabri *et al.*, 2000) y NKG2D (Meresse *et al.*, 2004). Este último es el receptor de activación involucrado en la citotoxicidad de células blanco, principalmente epiteliales. Dichas células se caracterizan por expresar la proteína MICA, un marcador de estrés celular (Roberts *et al.*, 2001; Allegretti *et al.*, 2013). Por otro lado, es importante mencionar que la IL-15 también inhibe parte de las respuestas supresora de las células Tregs (Benahmed *et al.*, 2007; Zanzi *et al.*, 2011).

Finalmente, es importante considerar que la mitad de los SNPs detectados en los GWAS 1 y 2, relacionan genes involucrados en la inducción de las vías de IFN tipo I, IFN tipo II y a la señalización por IL-15. Esto permite concebir a la EC como una patología donde

los pacientes presentan una tendencia a producir señales proinflamatorias que polarizan la respuesta adaptativa hacia la producción de células Th1 y células citotóxicas (Abadie *et al.*, 2011).

2.1.4.6 Fallo de la respuesta pro-tolerogénica

Enunciado: La respuesta inmune adaptativa en la EC presentan deficiencias en los mecanismos de tolerogénicos frente a los péptidos derivados de gluten. Esta respuesta deficiente se caracteriza por un defecto funcional en las células T regulatorias.

Discusión: Este enunciado ha sido demostrado extensamente por diferentes grupos de investigación, los cuales centraron su interés en comprender cuál es la causa que permite la falla en los mecanismos de tolerancia frente a péptidos de gluten en los pacientes celíacos. Se sabe que la respuesta a antígenos provenientes de la dieta requiere de células Tregs inducidas localmente (Commins, 2015). De esta forma, en un individuo no celíaco, con expresión de los HLA-DQ2/DQ8, esperaríamos encontrar células Treg específicas para péptidos derivados del gluten. Hipotéticamente, estas células deberían ser capaces de suprimir las eventuales respuestas proinflamatorias contra péptidos de gluten. Por lo tanto, esperaríamos que en los pacientes celíacos existiera una menor abundancia de estas células. Sin embargo, la evidencia muestra un incremento en poblaciones de células Tregs en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos activos. También, se han encontrado elevados niveles de mediadores clave en la respuesta pro-tolerogénica, como lo son las citoquinas IL-10 y el TGF β . De esta forma, se han demostrado aumento tanto de células T CD4⁺ FoxP3⁺ (Vorobjova *et al.*, 2009), de las células Treg FoxP3⁺ CD39⁺ circulantes (Cook *et al.*, 2017), como también de las células T CD4⁺ FoxP3⁻ IL-10⁺ (Tr1) (Gianfrani *et al.*, 2006), específicas de péptidos derivados de gluten en muestras de pacientes celíacos. Esto sugiere tres posibilidades, potencialmente coexistentes, capaces de explicar la deficiencia en la respuesta de las Tregs:

- 1) La respuesta Tregs es ineficiente frente a una respuesta T de tipo Th1 contra péptidos de gluten activa.
- 2) La existencia de mecanismos deficientes en estas células, aún no completamente dilucidados en la patología.
- 3) La existencia de mediadores ambientales, como la microbiota, que inhiban la capacidad regulatoria de estas células.

Las primeras dos propuestas se pueden discutir experimentalmente de forma parcial. Esto se debe a que ciertos estudios han demostrado la poca capacidad supresora de las poblaciones de células circulantes Treg FoxP3⁺ CD39⁺ sobre las células T efectoras específicas del gluten derivadas de pacientes celíacos (Cook *et al.*, 2017). A su vez, se ha confirmado que, en ensayos *ex vivo*, el agregado de IL-10 recombinante en biopsias de pacientes celíacos no tratados (Salveti *et al.*, 2005), o en tratamiento (Gianfrani *et al.*, 2006), inhibe la inducción de una respuesta T proinflamatoria específica contra el gluten. Al mismo tiempo, se corroboró que en las células Tr1 reactivas provenientes de pacientes celíacos en tratamiento (diferenciadas *ex vivo* en presencia de IL-10) son capaces de frenar respuestas de células T efectoras. Dicha capacidad parece depender de la secreción de IL-10 y TGF β (Gianfrani *et al.*, 2006). Estos resultados indicarían que la respuesta Treg en la enfermedad puede estar inhibida por factores locales presentes en la mucosa intestinal celíaca.

Como se mencionó antes, IL-15 podría cumplir un rol fundamental en la inhibición de la respuesta de las Tregs presentes en la mucosa. En particular, se comprobó que IL-15

inhibe la señalización mediada por TGF β (Benahmed *et al.*, 2007; Bernardo *et al.*, 2008; Zanzi *et al.*, 2011).

Finalmente, se ha estudiado la influencia de ciertos componentes de la microbiota sobre las Tregs. Es posible que la disbiosis intestinal, presente en los pacientes celíacos activos y caracterizada por una disminución de géneros productores de lactato, sea capaz de inducir cambios epigenéticos en la expresión de FoxP3. Estos cambios se caracterizan por la inducción de variantes por empalme alternativo del gen *FOXP3* no funcionales (ej.: *FOXP3A2*). De esta manera, aunque el número relativo de células Tregs de tipo CD4⁺FoxP3⁺ este aumentado, estas células no serían totalmente funcionales frente a células Th1 activas en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos activos (Serena *et al.*, 2017).

Aún quedan varios aspectos por investigar en relación con la funcionalidad de las Tregs en EC. En especial, estudiar si los mecanismos de anergia, u otros mecanismos de inhibición que requieren contacto celular, están alterados en la patología (Mazzarella, 2015; Chander *et al.*, 2018).

2.1.4.7 Progresión de la enfermedad de forma crónica

Enunciado: Una vez iniciada la respuesta adaptativa, se produce una respuesta proinflamatoria en la mucosa duodenal del paciente celíaco en respuesta a los péptidos derivados de gluten de la dieta. Dicha respuesta se perpetuará en el tiempo hasta que se restrinja el consumo de gluten.

Discusión: Este enunciado se basa en que la única terapia exitosa en pacientes celíacos es la estricta libre de gluten (Freeman, 2017). De esta forma, los pacientes celíacos que siguen una dieta libre de gluten revierten prácticamente el daño histológico ocasionado por la respuesta inmune: el infiltrado linfoide en la mucosa duodenal, la presencia de atrofia vellositaria, la positividad al panel de anticuerpos y la sintomatología. El reingreso del gluten a la dieta en estos pacientes conlleva a la reaparición de los signos y síntomas (Kumar *et al.*, 1979; Dotsenko *et al.*, 2021). Esto claramente implica al gluten como principal factor en la progresión de la enfermedad. Por todo ello, varios investigadores han estudiado distintas estrategias terapéuticas complementarias para evitar la progresión de la enfermedad en celíacos que consumen gluten. De esta forma, se han desarrollado diferentes fármacos capaces de afectar diversos puntos clave para los nodos presentados en el modelo. Se han propuesto la suplementación enzimática, con enzimas glutenásicas con actividad de endo-prolilproteasas (Bethune and Khosla, 2012), bloqueantes del ingreso paracelular epitelial (Bakshi *et al.*, 2012), inhibidores de la TG2 (Badarau, Collighan and Griffin, 2013), e inhibidores de la presentación de antígenos en entornos HLA-DQ2 (Xia *et al.*, 2006) Sin embargo, hasta el presente ninguna de estas estrategias demostró eficacia y seguridad adecuadas. De esta forma, el consumo de gluten en estos individuos induce una serie de mecanismos mixtos, y redundantes, que aseguran la perpetuación de un contexto proinflamatorio en la mucosa intestinal celíaca.

Por todo lo discutido y en línea con los modelos actuales de la respuesta inmune, generamos la siguiente hipótesis, aún inconclusa, sobre el mecanismo de la progresión de la enfermedad:

“Una vez que se consume un alimento con gluten, la microbiota presente en los pacientes celíacos, genera grandes cantidades de péptidos inmunogénicos (por ejemplo, 33-mer) y/o proinflamatorios (por ejemplo, p31-43). Dado que estos péptidos ahora son más abundantes que en condiciones normales, y se encuentra

una mayor permeabilidad intestinal (consecuencia de la excesiva respuesta inflamatoria), la llegada de péptidos a la *lamina propria* se ve aumentada. Una vez allí, la TG2 cuya expresión y activación están aumentadas, deamida los péptidos derivados de gluten que se unirán con mayor afinidad las moléculas HLA de susceptibilidad. Debido a la elevada concentración local de IFN γ , las células presentadoras de antígenos son más activas en procesar y presentar estos péptidos, así como en activar a linfocitos T por la expresión de moléculas coestimuladoras. Las células dendríticas, en el entorno proinflamatorio, diferenciarán a los linfocitos T hacia células Th1, que liberan más IFN γ y TNF α al medio, perpetuando la inflamación y el daño tisular. De esta forma, el estrés inflamatorio y metabólico ocasionado en diversas células conlleva a la muerte celular, ya sea por mecanismos intrínsecos, por medio de células citotóxicas estimuladas por el ambiente inflamatorio, o por procesos de muerte celular proinflamatorios (por ejemplo, piroptosis, necroptosis, ferroptosis). Este daño tisular, amplifica la respuesta inflamatoria liberando señales de daño, como las “alaminas”. En consecuencia, se estimula la producción de MMPs por fibroblastos, lo que prolongan e intensifican el daño de la matriz extracelular.

Cuando este proceso es sostenido en el tiempo, el recambio epitelial acelerado conlleva a la presencia de enterocitos inmaduros y una disminución de la capacidad de absorción, que desencadena un síndrome de malabsorción. Al mismo tiempo, la respuesta inflamatoria, por medio de la inducción de la citoquina IL-15, inhibe la actividad de las células Treg específicas contra péptidos derivados del gluten. Por otro lado, la interacción de células T y B estimula la producción de anticuerpos IgA contra péptidos derivados de gluten. Estos anticuerpos forman complejos en el lumen intestinal que, por medio de un transporte selectivo y protegido por CD71, logran pasar la barrera epitelial. Es así como los péptidos derivados de gluten se encuentran en *lamina propria* donde, en presencia de un entorno proinflamatorio, producen la activación de nuevas células T proinflamatorias.

La respuesta inmune proinflamatoria se detiene cuando el paciente sigue una dieta libre de gluten, ya que evita la generación de células T de perfil Th1-Th17, como también inhibe la activación de poblaciones preexistentes. En conclusión, esto permite que las señales de reparación tisular y las señales regulatorias retomen el control, reparando el daño local.”

Estos mecanismos siguen en estudio y su conocimiento detallado permitirá el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas y preventiva para los pacientes celíacos.

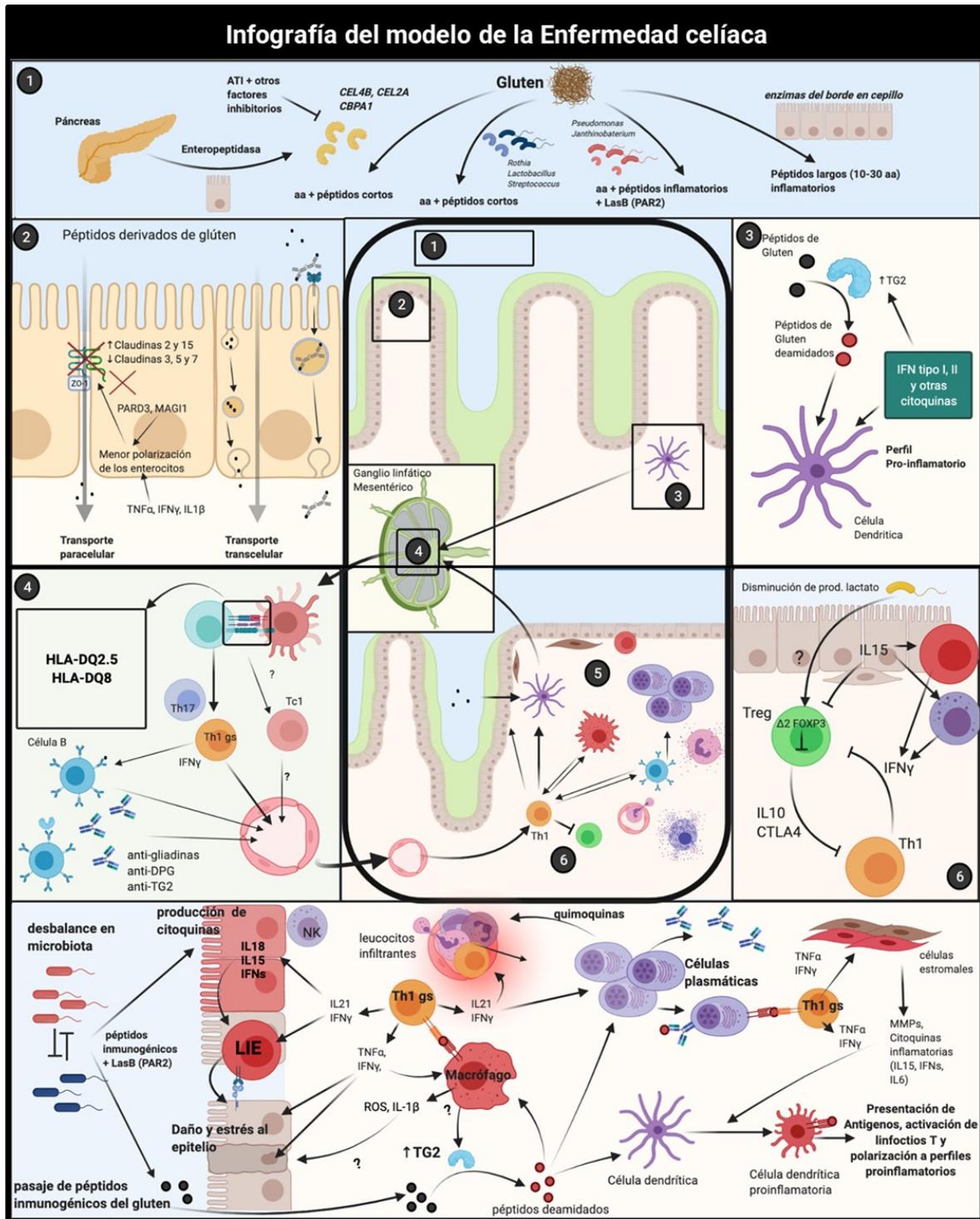


Figura 5-Modelo de la Enfermedad Celíaca. Comentado en la **sección 2.1.1.** aa: Aminoácidos libres, “?”: mecanismo desconocido, TG2: Transglutaminasa 2, PAR2: Receptor activado por proteínas, CEL4B/2A y CBP1: genes de elastasas, la carboxipeptidasa, respectivamente, LasB: Elastasa de *Ps. auriginosa*, Tc1: Células T citotóxicas con perfil Th1. Th1 gs: células Th1 específicas del gluten.

2.2 Tabla de genes asociados a SNPs predisponentes de la enfermedad celíaca

Estudio	Locus	Genes implicados	Función conocida de los genes	¿Es un cis-eQTL?
Pre-GWAS	6q21	<i>HLA-DQA1</i> , <i>HLA-DQB1</i>	Presentación de péptidos a células T CD4+	NO
GWAS #1	4q27	<i>KIAA1109</i> , <i>ADA1</i> , <i>IL2</i> , <i>IL21</i>	IL-2 y IL-21 activación de células T	NO
	1q31	<i>RGS1</i>	Activación y proliferación de células B.	SI
	2q12	<i>IL1RL1</i> , <i>IL18R1</i> , <i>IL18RAP</i> , <i>SLC9A4</i>	IL1RL1, IL18R1, IL18RAP: Activación del Sistema Inmune. SLC9A4 regula el pH intracelular	SI (IL1RL1, IL18RAP)
	3p21	<i>CCR1</i> , <i>CCR2</i> , <i>CCR3</i>	Quimiotaxis y activación de células del sistema inmune	SI
	3q25	<i>IL21A</i> , <i>SCHIP1</i>	IL21a: Regulación de la diferenciación a Th1, SCHIP1: Supresión de tumores	SI
	3q28	<i>LPP</i>	Rol en la estructura, morfología y adhesión celular.	SI
	6q25	<i>TAGAP</i>	Activación de células T y cambios en el citoesqueleto	SI
	12q24	<i>SH2B3</i> , <i>ATXN2</i>	SH2B3: Activación de células T, ATXN2: Estabilizador de ARNm	SI(SH2B3)
	2q31	<i>ITGA4</i> , <i>UBE2E3</i>	ITGA4: activación, migración y adhesión de células inmunes, UBE2E3: procesos de ubiquitinación.	SI(UBE2E3)
	2p16	<i>REL</i> , <i>PUS10</i>	REL: intermediario en la vía del NF-kB, PUS10: Modificación de nucleótidos post-transcripción.	NO
	6q23	<i>OLIG3</i> , <i>TNFAIP3</i>	OLIG3: desarrollo neuronal, TNFAIP3: intermediario en la vía del NF-kB y mediador de la apoptosis por TNF α	NO
	2q33	<i>CTLA4</i> , <i>ICOS</i> , <i>CD28</i>	Interviene en la activación de células B y T (CTLA4: Inhibidor; ICOS y CD28 Activadores)	SI (ICOS, CD28)
	18p11	<i>PTPN2</i>	Diferenciación y Activación de células T	NO

GWAS #2	1p36	<i>TNFRSF14, MMEL1</i>	TNFRSF14: Interviene en la señalización de la Respuesta inmune, MMEL1: Interviene en el metabolismo de las fosforilaciones.	SI
	1p36	<i>RUNX3</i>	Diferenciación tímica de células T	NO
	1q32	<i>C1orf106</i>	Regulador de las uniones adherentes de células epiteliales por medio de la regulación de la cytohesina-1	NO
	2p13	<i>PLEK, FBXO48</i>	PLEK: participa de la reorganización del citoesqueleto	SI(PLEK)
	3p21	<i>CCR4, GLB1</i>	CCR4: Quimiotaxis, reclutamiento y diferenciación de células de sistema inmune. GLB1: Hidrólisis de conjugados a glúcidos.	NO
	3p13	<i>ARHGAP31</i>	Tráfico de proteínas	SI
	6q15	<i>BACH2</i>	Regulación de la respuesta celular y humoral del sistema inmune.	NO
	6q22	<i>PTPRK, THEMIS</i>	PTPRK: Interviene en la adhesión intercelular e inhibe las señales por el EGFR. THEMIS: Diferenciación tímica de linfocitos T.	NO
	8q24	<i>PVT1</i>	PVT1: Participa en procesos de translocación de proteínas	NO
	10q22	<i>ZMIZ1</i>	Regulación de factores activadores de la transcripción	SI
	11q23	<i>ETS1</i>	Interviene en la diferenciación, proliferación de linfocitos	NO
	16p13	<i>CIITA</i>	Regulación de la transcripción de genes HLA clase II	NO
	16p13	<i>SOCS1, PRM1, PRM2</i>	SOCS1: Inhibidor intracelular de señales de citoquinas, PRM1 y2: desarrollo celular.	SI(SOCS1)
	21q22	<i>ICOSLG</i>	Activación y proliferación de células T.	NO
Inmunochip	1q23	<i>FASLG, TNFSF18</i>	Procesos citotóxicos	NO
	2q32	<i>STAT4</i>	Diferenciación de células T	NO

	6p25	<i>IRF4</i>	Regulador de la señalización por TLRs y procesos de la inmunidad innata	NO
	7p14	<i>ELMO</i>	Involucrado en la fagocitosis y migración celular.	SI
	10p15	<i>PFKFB3, PRKCQ</i>	PFKB3: Regulación del estrés oxidativo, PRKCQ: involucrado en la vía de señalización NF-kB en células T.	NO
	11q23	<i>POU2AF1, C11orf93(COLCA2)</i>	POU2AF1: Desarrollo y función de linfocitos B.	NO
	11q23	<i>TREH, DDX6</i>	TREH: Hidroliza trehalosa en respuesta al estrés celular, DDX6: Degradación e inhibición del ARNm	NO
	14q22	<i>ZFP36L1</i>	Regulación de la respuesta a factores de crecimiento y reparación de heridas.	NO
	15q24	<i>CLK3, CSK, ULK3</i>	CLK3: Regulación de procesos de corte y empalme de ARNm; CSK: Regulación de crecimiento celular; ULK3: Regulación de la vía "Hedgehog" y de la autofagia.	SI (SCK, ULK3)
	21q22	<i>UBASH3A</i>	Regulación de Apoptosis y vías de señalización en células T.	NO
	2q11	<i>UBE2L3, YDJC</i>	UBE2L3: Interviene en procesos de señalización de la vía NF-kB	SI (UBE2L3)
	Xq28	<i>HCFC1, TMEM187, IRAK1</i>	HCFC1: Control del ciclo celular, IRAK1: interviene en diferentes funciones de la inmunidad innata	SI (TMEM187)
	1q25	<i>NCF2</i>	Regula procesos de respuesta al estrés oxidativo	NO
	1q41	<i>DUSP10</i>	Regula procesos de la inmunidad innata y de respuesta al estrés oxidativo	NO
Mapeo de zonas HLA	6p21	<i>HLA-B</i>	Presentación de péptidos a células T CD8+	NO
	6p21	<i>HLA-DPB1</i>	presentación de péptidos a células T CD4+	SI
	6p21	<i>HLA-F</i>	presentación de péptidos a células T CD8+	SI

	6p21	<i>B3GALT4</i>	Interviene en la síntesis de gangliósidos	SI
Metanálisis de datos de Inmunochip	20q13	<i>ZNF335</i>	Regulación de la expresión génica por medio del cambio de estado de la cromatina	NO
	1p31	<i>NF1A</i>	Interviene en la diferenciación del linaje mieloide y el sistema nervioso central.	NO

Tabla 6- Genes asociados a la enfermedad celíaca descritos mediante técnicas de genotipificación masivas (Dieli-Crimi, Cénit and Núñez, 2015).

3 Materiales y métodos

3.1 Biopsias Duodenales de Pacientes

Las Muestras de mucosa duodenal fueron obtenidas de pacientes que asistieron a servicios de Gastroenterología de los Hospitales “Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor María Ludovica de La Plata” y el “Hospital Interzonal de Agudos General José de San Martín de La Plata” como parte del protocolo convencional de diagnóstico para enfermedades gastro-intestinales. El protocolo de obtención de muestras fue aprobado por los comités de ética de cada uno de los hospitales, como también avalado por los pacientes, o sus tutores, mediante el consentimiento escrito. Las muestras de Biopsias Duodenales se obtuvieron por la técnica de desgarre de la mucosa de la segunda porción de duodeno mediante una endoscopia realizada por personal médico de los servicios mencionados.

Se incluyeron dos clases de poblaciones: Celíacos Activos (ACD) y No celíacos (NC) de acuerdo con los datos endoscópicos, histológicos y serológicos de los pacientes. Siendo la población ACD positiva para anticuerpos DPG o TTG (tipo IgA o IgG), mostrando signos endoscópicos relacionados con la enfermedad celíaca y presentando una histología con enteropatía superior al Marsh I. La población no celíaca, no presentó positividad serológica, signos endoscópicos de inflamación o daño en el duodeno, y presentó una histología de la mucosa duodenal con Marsh igual o menor a I.

3.2 Muestras de Sangre de Pacientes

Las muestras Sanguíneas fueron obtenidas por personal médico de cada uno de los Hospitales. La sangre se depositó en tubos sin conservantes o anticoagulantes para la obtención de suero.

3.3 Determinación de la concertación en Suero de IL-33 y ST2s

La concentración de IL-33 y su receptor soluble ST2s fue realizada en el suero de pacientes celíacos y controles no celíacos mediante el uso de kits de ELISA comerciales en el laboratorio de la Dra. Marcela Hermoso en el Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia, Chile. Para ST2s se utilizó un kit de R&D System (cat.: DY523) y para IL-33 se utilizó uno proveniente de la empresa Abcam (cat.: ab119547). Se procedió a las medidas siguiendo las indicaciones de cada fabricante.

3.4 Inmunofluorescencia de muestras embebidas en Parafina (IFP)

3.4.1 Preparación de muestras para IFP

Las muestras se fijaron en formol al 4%, y luego fueron deshidratadas en un tren de concentraciones crecientes de alcohol y dejándolas un día en xilol. Más tarde se realizó la inclusión de las muestras deshidratadas en parafina a 65°C. Posteriormente se dejó enfriar las muestras en moldes adecuados.

3.4.2 Procesamiento de muestras en parafina para IFP

Las muestras embebidas en tacos de parafina fueron cortadas en secciones de 5 micrones de espesor y adheridas sobre vidrios positivados mediante la técnica de flotación. Los vidrios fueron incubados en estufa a 65°C durante 45-60 minutos. A continuación, se extrajo la parafina con 3 pasajes por soluciones de Xilol, y luego se las paso por un tren de hidratación. Más tarde se procedió a realizar la recuperación antigénica mediante la

incubación de los vidrios en olla de vapor eléctrica con una solución de citrato de sodio 10mM durante 15-20 min a 95°C y aproximadamente 1.5 atms de presión. Posteriormente se realizó la demarcación de la zona con fibrón hidrofóbico, para luego bloquear los tejidos con una solución de bloqueo adecuada para la marca, las condiciones fueron 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se incubó durante 16 h en cámara húmeda a 4°C con la dilución del anticuerpo primario o el correspondiente control de isotipo. Más tarde, se realizaron lavados con Solución Salina Tampón de Fosfato (PBS) con 0.1% Polisorbato 20 (Tween-20). Inmediatamente luego, se incubó durante una hora a Temperatura ambiente con la solución del anticuerpo secundario adecuado en cámara húmeda. La tinción nuclear se realizó como paso final, con una solución de Yoduro de Propidio o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Posteriormente, se realizó el montaje del cubre con una solución comercial de montaje húmedo.

3.5 Inmunofluorescencia de muestras Congeladas (IFFr)

3.5.1 Preparación de muestras para IFFr

Las Muestras se fijaron con Paraformaldehído al 4% en PBS por 6 horas, y posteriormente se las incuban por 16 h en una solución de Paraformaldehído 2%, Sacarosa 30% en PBS a 4°C. Luego se procedió a incluirlas en una matriz adecuada (Voligoma®) para congelarla con un pasaje rápido por nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -80°C.

3.5.2 Procesamiento de muestras para IFFr

Mediante un criostato se procedió a cortar las muestras en cortes de 10 micras de espesor que se depositan sobre vidrios positivados. Para marcarlas se procedió a descongelar los cortes a temperatura ambiente por 5 minutos, para luego incubarlas en PBS fresco por otros 5 minutos. Posteriormente se realiza la demarcación de la zona con el tejido con fibrón hidrofóbico y se bloquea el tejido con solución de bloqueo adecuada. A continuación, se incubó 16 h en cámara húmeda con una solución del anticuerpo primario o control de isotipo disuelto en solución de bloqueo. Después se realiza una serie de 3 lavados con PBS Tween-20 0.1%. A continuación, se realiza la incubación por 1hr en cámara húmeda con el anticuerpo secundario disuelto en solución de bloqueo. Más tarde, se procede a realizar una serie de 3 lavados con PBS Tween-20 0.1%. La tinción nuclear se realizó como paso final, con una solución de Yoduro de Propidio o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ThermoFisher) Subsiguientemente, se realizó el montaje del cubre con una solución comercial de montaje húmedo.

Los anticuerpos y soluciones utilizadas en las IFFr y IFP se mencionan en la **Tabla 7**.

<i>Blanco Molecular</i>	<i>Reactividad con Especie</i>	<i>Concentración/Dilución usada</i>	<i>Huésped</i>	<i>Clon</i>	<i>Conjugaciones</i>	<i>Fabricante</i>
<i>IL-33</i>	Humano	10 ug/ml	Cabra	IgG Policolonal	-	R&D Systems
<i>ST2</i>	Humano	10 ug/ml	Cabra	IgG Policolonal	-	R&D Systems
<i>CD45</i>	Humano	IFP:1:30 ; IFFr:1:200	Raton	IgG Policolonal	PerCP-Cy5.5	ebioscience

Materiales y métodos

<i>CD3</i>	Humano	IFP:1:50 ; IFFr:1:200	Raton	IgG Policlonal	APC	ebioscience
<i>CD138</i>	Humano	IFP:1:30 ; IFFr:1:200	Raton	M15	APC	ebioscience
<i>CD20</i>	Humano	IFFr:1:50	Raton	2H7	APC	ebioscience
<i>SMA</i>	Humano	IFP:1:100 ; IFFr:1:300	Raton	B4	-	Santa Cruz Biotechnology
<i>CD31</i>	Humano	IFP:1:50 ; IFFr:1:100	Raton	IgG Policlonal	-	Abcam
<i>CD64</i>	Humano	IFFr:1:100	Raton	10.1	PerCP- Cy5.5	Biologend
<i>CD8</i>	Humano	IFFr:1:100	Raton	RPA-T8	PerCP- Cy5.5	Biologend
<i>IL-33</i>	Raton	IFP:1:50 ; IFFr:1:200	Cabra	IgG Policlonal	-	R&D Systems
<i>CD31</i>	Raton	IFP:1:50 ; IFFr:1:200	Conej o	IgG Policlonal	-	Abcam
<i>Prosl</i>	Humano	IFP:1:150	Raton	F10	-	Santa Cruz Biotechnology
<i>Gas6</i>	Humano	IFP:1:200 ; IFFr:1:300	Conej o	IgG Policlonal	-	Abcam
<i>Tyro-3</i>	Humano	IFFr:1:100	Conej o	IgG Policlonal	-	Novus Biologicals
<i>Axl</i>	Humano	IFFr:1:100	Cabra	IgG Policlonal	-	Novus Biologicals
<i>MerTK</i>	Humano, Raton	IFFr:1:100	Cabra	IgG Policlonal	-	Novus Biologicals
<i>IL-17a</i>	Humano	IFP:1:200	Cabra	IgG Policlonal	-	BioRad
<i>IL-21</i>	Humano	IFP:1:100	Cabra	IgG Policlonal	-	BioRad
<i>IgG</i>	Raton	1:400	Cabra	IgG Policlonal	Alexa-488	ThermoFisher
<i>IgG</i>	Raton	1:600	Burro	IgG Policlonal	Alexa-647	Abcam
<i>IgG</i>	Conejo	1:600	Burro	IgG Policlonal	Alexa-647	Abcam
<i>IgG</i>	Cabra	1:400	Burro	IgG Policlonal	Alexa-488	ThermoFisher

IgG	Conejo	1:300	Cabra	IgG Policolonal	Alexa-488	ThermoFisher
Control Isotipo	-	depende del primario	cabra	IgG Policolonal	-	R&D Systems
Control Isotipo	-	depende del primario	conejo	IgG Policolonal	-	Santa Cruz Biotechnology
Control Isotipo	-	depende del primario	Ratón	IgG Policolonal	-	Abcam

Solución de Lavado: PBS Tween-20 0,1%, pH:7,4

Solución de Bloqueo: PBS 1x, Glicina 0,3 M, FBS 5%, Tween-20 0,1%, Tritón X-100 0.02% pH:7,4

Tabla 7-Reactivos utilizados para las técnicas de IFFr e IFP.

3.6 Adquisición de Imágenes

Las Imágenes de Epifluorescencia adquirieron en 2 microscopios diferentes: Nikon Ti-Eclipse de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, y el Zeiss Apotome del Instituto de Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE-CIC). Las Imágenes de microscopia confocal se obtuvieron con el microscopio Confocal Leica SP5 de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP. En cada uno de los casos se utilizaron diferentes objetivos (10x, 20x, 40x y 63x) y fuentes de luz según los fluorocromos a evaluar.

3.7 Procesamiento de Imágenes

Se utilizó el software libre FIJI (FIJI is just Image-J) para el procesamiento de las imágenes. El Software Excel del paquete Office-365 de Microsoft Corporation para la organización de los datos adquiridos y cálculo de las diferentes medidas.

El procesamiento de las imágenes incluyó diferentes tipos de medidas:

3.7.1 **Densidad de Células (δ)**

Consta del recuento manual de células en áreas definidas manualmente y corregidas por software mediante algoritmos de umbralización de zonas con presencia de tejido. La densidad se calculó según la fórmula:

$$\delta = \frac{\sum_{i=0}^n Ci}{\sum_{i=0}^n Ai}$$

Donde “Ci” es el número de células positivas en la sección “i” de Área “Ai”, considerando una muestra de “n” secciones. Las unidades son C/ μm^2 .

3.7.2 **Proporción de Células (ρ)**

Consta del recuento manual de células positivas y negativas en áreas definidas manualmente. La proporción se calculó según la fórmula:

$$\rho = 100x \frac{\sum_{i=0}^n Ci}{\sum_{i=0}^n (Ci + Zi)}$$

Donde “ C_i ” es el número de células positivas en la sección “ i ”, Z_i es el número de células negativas en la sección “ i ”, considerando una muestra de “ n ” secciones. Las unidades son relativas y se consideran como Porcentaje de Células positivas (%).

3.7.3 Densidad Relativa de Fluorescencia (RFD)

Se calculo como la intensidad de Fluorescencia total corregida “ F_i ” en la sección “ i ” en el área “ A_i ” de esa misma sección, considerando una muestra de “ n ” secciones.

$$RFD = \frac{\sum_{i=0}^n F_i}{\sum_{i=0}^n A_i}$$

Las unidades del RFD son en unidades de fluorescencia relativa en un área definida (μm^2). La F_i se obtiene mediante el software FIJI, en la sección definida manualmente. Sin embargo, la F_i se obtiene luego de que el software realice la sustracción del ruido. Éste se consideró como, al menos, la fluorescencia media del control negativo más 2.5 o 3 dispersiones estándares de éste. Dado que la intensidad de fluorescencia es altamente dependiente de los componentes del microscopio, de la intensidad de la fuente de luz y diferentes aspectos del detector, se procedió a obtener la totalidad de las imágenes a las cuales se les calculo el RFD en un muestras preparadas con las mismas diluciones de los anticuerpos, en un único día, y con la misma configuración del equipo de obtención de imágenes.

3.8 RT-qPCR

Las muestras fueron incubadas durante 4-6 h a 4°C con una solución preservante del ARN “RNAlater Invitrogen”. Posteriormente se les substrajo el preservante y se las almacenó a -80°C. La extracción del ARN total se realizó mediante el uso de un kit comercial RNAspin Mini Kit de GE Healthcare. El ARN extraído fue cuantificado mediante absorbancia de luz de 260 nm de longitud de onda. Más tarde se procedió a realizar la reacción de reto-transcripción con el uso del kit: Invitrogen™ M-MLV Reverse Transcriptase, siguiendo el protocolo de termociclado recomendado por el fabricante. Para la realización de la qPCR se utilizó el kit comercial Invitrogen™ Sybr-Green, la cicladora usada fue la iCycler acoplada a un módulo óptico iQ5 de BioRad. Las secuencias cebadoras para cada gen se encuentran listadas en la **Tabla 8**. Estas fueron diseñadas u obtenidas de bases de datos comerciales como la Origene® o procedentes de publicaciones libres disponibles en la Web. En todos los casos se chequearon los productos de amplificación por singularidad de picos durante protocolos de fusión de los amplicones obtenidos, como también con geles de agarosa. El protocolo que se siguió para la qPCR fue: 1° ciclo: 10 min a 95°C; 2° ciclo: 15 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 1min a 72°C; 3° ciclo: Rampa de temperaturas para detección de punto de fusión desde 55°C a 95°C. El 2° ciclo se repitió 45-50 veces. Los datos de Fluorescencia relativa y de Ciclo de corte (“Threshold Cycle”, Ct) fueron obtenidos gracias al software iQ5 de BioRad y los datos se analizaron mediante el uso del software Excel del paquete Office 365 de Microsoft Corporation. Los cálculos se realizaron según la ecuación:

$$\text{Nivel Relativo de ARN} = 2^{(Ct(HK) - Ct(Gen))}$$

Donde el “ $Ct(HK)$ ” corresponde al ciclo de corte del gen considerado “House-keeping” o “Constitutivos” (**Tabla 8**) que se utilizan como normalizadores del nivel relativo para muestras de diversa cantidad de copias totales de ARN. El “ $Ct(Gen)$ ” es el ciclo de corte del gen de interés. Para el caso de los ensayos sobre cultivos celulares se realizó una normalización relativa a la condición control, donde el valor medio del nivel relativo de

ARN de cada una de las condiciones se dividió por el valor medio del nivel relativo de ARN de la población control.

<i>Gen/Varian</i> <i>te</i>	<i>RefSeq</i> <i>(NCBI)</i>	<i>Secuencia FW</i>	<i>Secuencia RV</i>	<i>Sección</i>
<i>AGER</i>	NM_001136.5	GACCCTGGAAGGAAGC AG	CCCCTTACACTTCAGCA CC	A
<i>HMGB1</i>	NM_001313892.1	ATATGGCAAAGCGGA CAAG	AGGCCAGGATGTTCTCC TTT	A
<i>IL1A</i>	NM_001371554.1	TCCCAATCTCCATTCCC AAA	AGCCCCGGGAGGTATGC	A
<i>IL33</i>	NM_001199640.2	AATCAGGTGACGGTGTT G	ACACTCCAGGATCAGTC TTG	A
<i>IL1RL1</i> <i>(ST2L)</i>	NM_016232.5	ATGTTCTGGATTGAGGC CAC	GACTACATCTTCTCCAG GTAGCAT	A
<i>IL1RL1</i> <i>(ST2s)</i>	NM_001282408.1	GGCACACCGTAAGACTA AGTA	CAATTTAAGCAGCAGAG AAGCTCC	A
<i>EEF1A1</i>	NM_001402.6	TCGGGCAAGTCCACCAC TAC	CCAAGACCCAGGCATAC TTGA	A, B y C
<i>IFNB1</i>	NM_002176.4	TGGGAGGCTTGAATACT GCCTCAA	TTCATAGATGGTCAAT GCGGCGT	A, B y C
<i>IFNG</i>	NM_000619.3	GCAGAGCCAAATTGTCT CCT	ATGCTCTTCGACCTCGA AAC	A, B y C
<i>IRF1</i>	NM_001354924.1	GAGGAGGTGAAAGACC AGAGCA	TAGCATCTCGGCTGGAC TTCGA	A, B y C
<i>IL10</i>	NM_000572	TCTCCGAGATGCCTTCA GCAGA	TCAGACAAGGCTTGCA ACCCA	B
<i>IL17A</i>	NM_002190.3	CCTCAGATTACTACAAC CGA	GACACCAGTATCTTCTC CAG	B
<i>IRF7</i>	NM_001572.5	CCACGCTATAACCATCTA CCTGG	GCTGCTATCCAGGGAAG ACACA	B
<i>IRF8</i>	NM_001363907.1	AGGTCTTCGACACCAGC CAGTT	GCACGAGAATGAGTTTG GAGCG	B
<i>MX1</i>	NM_001144925.2	GGCTGTTTACCAGACTC CGACA	CACAAAGCCTGGCAGCT CTCTA	B
<i>USP18</i>	NM_017414.4	TGGACAGACCTGCTGCC TTAAC	CTGTCCTGCATCTTCTCC AGCA	B
<i>SOCS1</i>	NM_003745.2	TTCGCCCTTAGCGTGAA GATGG	TAGTGCTCCAGCAGCTC GAAGA	B

<i>SOCS3</i>	NM_003955.5	CATCTCTGTCGGAAGAC CGTCA	GCATCGTACTGGTCCAG GAACT	B
<i>IFNLR1</i>	NM_170743.4	CAGCAAGTTCTCTAAGC CCACC	GTCATTCACGGACTCTG GTCTG	B
<i>IL22</i>	NM_020525.5	ACAACACAGACGTTTCGT CTCATTG	GAACAGCACTTCTTCAA GGGTGA	B
<i>IL23A</i>	NM_016584.3	AGCAGCTCAAGGATGGC ACTCAG	CCCCAAATTTCCCTTCCC ATCTA	B
<i>IFNL1</i>	NM_172140.2	AACTGGGAAGGGCTGCC ACATT	GGAAGACAGGAGAGCT GCAACT	B
<i>IFNL2/3</i>	NM_172138.2	TCGCTTCTGCTGAAGGA CTGCA	CCTCCAGAACCTTCAGC GTCAG	B
<i>AXL</i>	NM_001699.6	CCGTGGACCTACTCTGG CT	CCTTGGCGTTATGGGCT TC	C
<i>GAS6</i>	NM_000820.4	GGCAGACAATCTCTGTT GAGG	GACAGCATCCCTGTTGA CCTT	C
<i>MERTK</i>	NM_006343.3	CTCTGGCGTAGAGCTAT CACT	AGGCTGGGTTGGTGAAA ACA	C
<i>PROS1</i>	NM_000313.4	TGCTGGCGTGTCTCCTC CTA	CAGTTCTTCGATGCATTC TCTTTCA	C
<i>TYRO3</i>	NM_001330264.1	CGGTAGAAGGTGTGCCA TTTT	CGATCTTCGTAGTTCCTC TCCAC	C

Tabla 8-Secuencias de los cebadores utilizados en la técnica de RT-qPCR. En la columna “sección” se aclara en cual de las tres parte de la tesis que presentan resultados, se utilizaron el par de cebadores.

3.9 Western blot

Las muestras fueron colectadas en criotubos inmersos en hielo seco, para luego almacenarlas a -80°C . La extracción de proteínas se realizó mediante procesamiento de las muestras mediante el instrumento de dispersión Ultraturax®. Las muestras se procesaron en de inhibidores de proteasas comerciales (Roche cOmplete™) disueltos en una solución tampón de lisis de tejidos. Posteriormente, se realiza un paso de congelado y descongelado del procesado para ayudar a la lisis tisular. Finalmente, se centrifugan las muestras a 17.000 RCF en frío y se conservan las proteínas extraídas a -80°C . Se cuantificó la cantidad de proteínas totales por técnica de BCA mediante el uso del kit comercial Micro BCA™ Thermo-Fisher. Posteriormente se desnaturalizaron las proteínas por incubación con 2-Mercaptoethanol, SDS y calor (incubación por 10 minutos a $100-95^{\circ}\text{C}$). Las muestras fueron sembradas a 30 μg de proteínas totales por calle en geles de poliacrilamida (12.5%, 10% o 14% dependiendo del peso de la proteína) y 1 mm de espesor. Se utilizó un marcador de peso molecular apropiado (BluePlus® IV 10-180 kD). Las condiciones de corrida electroforética fueron reductoras y desnaturalizantes con amperaje constante a 45 mA y tiempo variable. Luego de correr las proteínas en el gel se realizó una transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm

(Amersham™) en condiciones de amperaje constante en 300 mA durante 60-80 min. Se realizó una tinción reversible con Ponceau-S para certificación de la transferencia a la membrana. Luego se bloqueó la membrana con diferentes soluciones de Bloqueo (**Tabla 9**) según el sistema a evaluar. Las condiciones de bloqueo fueron de 1hr en cámara húmeda a 35°C. Luego se incubó con Solución del Anticuerpo primario (**Tabla 9**) durante 16 h a 4°C en agitación continua. Seguidamente se lavó la membrana con solución de lavado TBS Tween-20 0.1%. Se incubó con el anticuerpo secundario adecuado en agitación a 35°C por 1 hr. Se repitieron los lavados con la solución adecuada. El revelado consistió en una reacción de quimioluminiscencia con el reactivo (GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent). Se utilizó el escáner LI-COR® para la obtención de las imágenes de la reacción. Los resultados fueron analizados con el software libre FIJI (FIJI is just Image-J), y el Software Excel del paquete Office-365 de Microsoft Corporation para la organización de los datos adquiridos y cálculo de las diferentes medidas.

Antígeno	Reactividad	Concentrac ión o Dilución usada	Huésped	Clon	Conjuga do	Fabricante
IL-33	Humano	0,4 ug/ml	Cabra	IgG Policlonal	-	R&D Systems
ST2	Humano	0,7 ug/ml	Cabra	IgG Policlonal	-	R&D Systems
IL-33	Ratón	0,4 ug/ml	Cabra	IgG Policlonal	-	R&D Systems
IL1a	Humano	1:200	Conejo	IgG Policlonal	-	Thermo
HMGB1	Humano	1:200	Conejo	IgG Policlonal	-	Thermo
Pros1	Humano	1:500	Raton	F10	-	Santa Cruz Biotechnology
Gas6	Humano	1:100	Conejo	IgG Policlonal	-	R&D Systems
Tyro-3	Humano	1:100	Conejo	IgG Policlonal	-	Novus Biologicals
Axl	Humano	1:100	Cabra	IgG Policlonal	-	Novus Biologicals
MerTK	Humano	1:100	Cabra	IgG Policlonal	-	Novus Biologicals
Beta- Actina	Humano, Ratón	1:1000	Conejo	IgG Policlonal	-	Abcam
IgG	Ratón	1:2000	Cabra	IgG Policlonal	HRP	Abcam

IgG	Conejo	1:2000	Cabra	IgG Policolonal	HRP	BioRad
IgG	Cabra	1:2000	Burro	IgG Policolonal	HRP	Abcam
Solución de lavado: TBS 1X, 0.1% Tween 20						
Solución de bloqueo: Leche descremada 3% v/v en TBS 1X, 0.1% Tween 20, centrifugada 1000 rcf x 5min.						
Solución de lisis de tejidos: NP-40 0.4%v/v, HEPES 0.02M, KCl 0.8%, EDTA 0.76%. pH=8.						

Tabla 9- Anticuerpos y Soluciones utilizadas para la técnica de Western Blot.

3.10 Cultivos de líneas celulares

3.10.1 HT-29

Las células de la línea HT-29, fueron utilizadas como modelo de células epiteliales de intestino. En todos los experimentos utilizados, las células fueron cultivadas en placas de plástico de 24 o 48 wells a una concentración inicial de $3-5 \cdot 10^5$ /mL hasta confluencia. El medio de cultivo consistió en el medio comercial “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM) de Gibco™, suplementado con Penicilina, Estreptomicina y 10% v/v de Suero Fetal Bovino (Internegocios™). Se realizó el cambio de medio cada 48-72 h según el nivel de confluencia de las células. Las células fueron cultivadas en presencia de 5% de CO₂ en estufa gaseada a 37°C. Los estímulos utilizados fueron listados en la

Tabla 10.

<i>Estimulo</i>	<i>Concentración</i>	<i>Fabricante</i>
<i>IFNG</i>	50 ng/mL	R&D systems
<i>Poli I:C</i>	100 ug/mL	Sigma
<i>p31-43</i>	100 ug/mL	Genecust

Tabla 10-Estimulos utilizados en cultivos de células HT-29.

3.10.2 HMEC-1

Las células de la línea HMEC-1, fueron utilizadas como modelo de células endoteliales. En todos los experimentos utilizados, las células fueron cultivadas en placas de plástico de 24 o 48 Wells a una concentración inicial de $3-5 \cdot 10^5$ /mL hasta confluencia de éstas. El medio de cultivo consistió en el medio comercial MCDB131 con 10% Suero Fetal Bovino, 10 ng/mL EGF (factor de crecimiento epidermal) 1 µg/mL Hidrocortisone, 10 mM Glutamina. Se realizó el cambio de medio cada 48-72 h según el nivel de confluencia de las células. Las células fueron cultivadas en presencia de 5% de CO₂ en estufa gaseada a 37°C. Para la realización de los estímulos se retiró la hidrocortisona 24 h antes. Todos los estímulos fueron realizados en el IMEX (instituto de medicina experimental). Los estímulos utilizados fueron listados en la siguiente tabla.

<i>Estímulo</i>	<i>Concentración</i>	<i>Fabricante</i>
<i>IFNG</i>	50 ng/mL	R&D systems
<i>IFNBI</i>	1000 UI/mL	Sigma

Tabla 11- Estímulos utilizados en cultivo de células HMEC-1.

3.11 Modelos Murinos

Se utilizaron animales macho de la cepa C57BL/6 de 7-8 semanas provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UNLP. Los ratones fueron ubicados en cajas plásticas y recibieron alimento balanceado y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados sobre los animales siguieron los protocolos y lineamientos éticos locales. Se utilizaron 3 tipos de estímulos y un control de vehículo, todos administrados en un volumen de 200uL de PBS por medio de una sonda intragástrica (22G, 3.8 cm). Los estímulos fueron:

1. Péptido “p31-43”: Péptido sintético de 13 aminoácidos (LGQQQPFPPQQPY). Sintetizado por Genecust, Luxenburgh. Se utilizó a una dosis de 10ug/Ratón.
2. Poly I:C: Ácido nucleico tipo ARN de doble cadena. Sintetizado por Sigma Aldrich. Se utilizó a una dosis de 30ug/g de Ratón.
3. Combinación de p31-43 y poly I:C en las dosis anteriores.

El control de vehículo fue una solución estándar de PBS esterilizado. Entre 4 y 16 h posterior a la administración del estímulo los animales fueron sacrificados para la obtención de muestras. Las muestras obtenidas fueron obtenidas a partir de 2 cm desde el estómago hacia adelante. Los cortes fueron realizados de forma sistemática con un largo de 1.5 cm y respetando el mismo orden de obtención de muestras para las diferentes técnicas entre los diferentes tratamientos. Las muestras fueron utilizadas para las técnicas Western-blot, extracción de ARN, análisis histológico e Inmunofluorescencia (IFFr e IFP).

3.12 Análisis histológico de muestras de ratón

3.12.1 Procesamiento de las muestras y obtención de imágenes

Las muestras obtenidas provinieron de animales tratados con los diferentes estímulos o controles luego de unas 16 h de la administración intra-gástrica. La conservación y preparación respetó lo descrito en la subsección 3.4. Posteriormente, mediante el uso del microtomo se realizaron cortes de 5 µm de espesor que fueron depositados sobre vidrios positivados por el método de flotación. Una vez secos, los vidrios fueron incubados en estufa a 65°C durante 45-60 minutos. A continuación, se extrajo la parafina con 3 pasajes por soluciones de Xilol, y luego se las paso por un tren de hidratación. Más tarde se realizaron 2 tinciones sucesivas con Hematoxilina y eosina. Los vidrios fueron montados con medio de montaje bálsamo de Canadá. Las imágenes de los tejidos fueron obtenidas con el microscopio Nikon Eclipse Ti. Las imágenes fueron adquiridas con cámara Nikon Digital Sight DS Ri1 usando el software Nis-Elements y las medidas fueron hechas usando el programa FIJI apropiadamente calibradas.

3.12.2 Recuento de LIEs

De las imágenes obtenidas con un aumento total de aproximadamente 400x, se eligieron al menos 10 vellosidades procedentes de un mismo animal correctamente orientadas. En las puntas de estas vellosidades se realizó el recuento de número de Linfocitos intraepiteliales (LIEs) en el epitelio correspondiente a los primeros 60 enterocitos (30 enterocitos por flanco de vellosidad). Los LIEs fueron reconocidos por sus características de tinción y morfología:

- Núcleo denso compacto, con coloración intensa.
- Citoplasma más claro y de menor área que el de los enterocitos circundantes.
- Ausencia de la localización su núcleo en fila con los núcleos de los enterocitos.

3.12.3 Determinación del ratio V/C

Con imágenes obtenidas a 100x-200x de aumento total, se eligieron al menos 10 vellosidades correctamente orientadas que presentaran 10 criptas contiguas con una correcta orientación. Se procedió a realizar las medidas de longitud de cripta y vellosidad para determinar el ratio V/C para cada conjunto de vellosidad/cripta en cada animal.

1.1.1 Interpretación de los resultados del análisis histológico

Los promedios de las medidas del ratio V/C y el recuento de LIEs por animal, fueron utilizados como 2 parámetros histológicos independientes. La disminución del dicho ratio V/C indicaría daño del tejido, y el aumento del recuento de LIEs indicaría una infiltración de linfocitos en el compartimento epitelial.

3.13 Análisis estadísticos

3.13.1 Comparación entre poblaciones

Se utilizó el software “Prism 8” de GraphPad para realizar el análisis estadístico de todas las comparaciones entre poblaciones. Para comparaciones simples entre dos condiciones o poblaciones, se utilizó el análisis de T-Student, en caso de que las poblaciones presentaran una desviación estándar significativamente diferente entre ellas, se realizó una corrección de Welch. Sin embargo, si las poblaciones a comparar no presentaban una distribución paramétrica, se utilizó el análisis de Man-Whitney como test estadístico. La determinación de normalidad de las poblaciones de datos fue realizada mediante los Tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Finalmente, si las comparaciones se realizaron en más de 2 poblaciones, se utilizó el test de ANOVA, post test de Tukey o Dunn dependiendo de tipo de población a tratar. En todos estos casos el $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los estudios de correlación entre factores se realizaron por test de Pearson o Spearman según el tipo de distribución de los datos. En cada situación de comparación se aclara que test fue utilizado en el epígrafe de la figura correspondiente.

3.13.2 Análisis de componentes principales (PCA)

Se utilizó el programa R-studio con el uso del lenguaje r (versión 4.1) y los paquetes “Factorextra”, “FactoMineR”, para el análisis de los datos por PCA. Debido a que se contaban con faltantes de datos, se utilizó el paquete “missMDA” para su imputación. En todos los casos, se utilizaron los pacientes donde al menos tuviesen medidos un número mínimo de los genes totales. Para el grafico de la parte B este número es 6/19, y para el

grafico de la parte C es 3/13. Este mínimo de genes medidos dependió de ciertos valores de ajuste recomendados por el paquete missMDA.

4 Parte A: Análisis de las Alarminas IL-33, IL-1 α y HMGB1 en Intestino Delgado

4.1 Introducción General a la Parte A

Las alarminas son productos endógenos, liberados al ambiente extracelular frente a un daño celular, capaces de inducir una respuesta del sistema inmune. Estos factores son considerados como parte de los DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) los cuales también incluyen los PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), entre otras moléculas¹ (Bianchi, 2007). En sus inicios, el modelo de la “Hipótesis del daño” (Danger Hypothesis) (Matzinger, 2002) proponía la existencia de estos elementos, relacionados con el daño tisular, como señales de “alarma” del sistema inmune. Estas señales también fueron sugeridas como mediadores de la inflamación estéril, es decir inflamación en ausencia de infecciones con patógenos. Las investigaciones subsiguientes encontraron exitosamente un amplio repertorio de señales tanto proteicas (IL-1 α , IL-33, HMGB1, Histonas, HSP, etc), como no proteicas (ATP, Urea, ADN, ARN, etc) que, al ser liberadas frente a daño tisular y/o muerte celular, son capaces de ser detectados por receptores celulares en células del sistema inmune (Zhen *et al.*, 2017). Esto confirmaba que el sistema inmune no responde únicamente reconociendo macromoléculas como propias o ajenas, sino también a señales que indican el daño a lo propio. De esta forma, el sinergismo entre señales provenientes de patógenos, como señales de moléculas endógenas liberadas en situaciones de estrés o daño, conllevan a una potente respuesta del sistema inmune. Estas respuestas han sido documentadas en diferentes situaciones proinflamatorias, tanto agudas: sepsis, infecciones; como crónicas. Entre las últimas se destacan las enfermedades reumáticas: Artritis reumatoidea, Lupus Eritematoso sistémico, o las enfermedades inflamatorias intestinales. De este modo, las alarminas juegan un rol importante en la gran mayoría de las respuestas inmunes y, sin embargo, se desconoce varias de sus funciones y/o receptores (Pisetsky, Erlandsson-Harris and Andersson, 2008; Chan *et al.*, 2012; Millar, Murrell and McInnes, 2013; Nefla *et al.*, 2016; Boteanu *et al.*, 2017).

Hasta el momento de escritura de esta tesis se han verificado diferentes mecanismos de liberación de las alarminas; no obstante, se reconoce que el conocimiento de este sistema es aún incipiente. Uno de los mecanismos que se propusieron inicialmente es la necrosis celular, es decir una muerte celular no regulada y repentina de las células que es capaz de liberar alarminas de forma pasiva. Actualmente, se han incorporado otros mecanismos de muerte celular regulados capaces de liberar estas moléculas de forma activa al ambiente extracelular, estos son: la necroptosis, la piroptosis, la ferroptosis, entre otros (Rider *et al.*, 2017; Zhen *et al.*, 2017; Sarhan *et al.*, 2018). En conjunto, todas estas formas de muerte celular son consideradas proinflamatorias, lo contrario a lo supuesto para el mecanismo apoptótico, donde la muerte celular es estrictamente regulada para evitar la liberación de contenido celular y la inducción de inflamación local. De esta forma, las alarminas cobran importancia, pues varias de ellas (IL-33, IL-1 α , HMGB1, entre otras) son únicamente liberadas en formas bioactivas en condiciones de muerte no apoptóticas (Rider *et al.*, 2017). Esto permite entender cómo el recambio normal de células en un tejido no conlleva a producir inflamación, mientras que si ocurre cuando existe muerte celular necrótica (aún sin infección) acompañada de daño tisular. A su vez, los procesos de muerte celular proinflamatorios también son inducidos durante infecciones con patógenos, entorno donde coexiste una activación del sistema inmune por PAMPs y

¹ Debemos aclarar que algunos autores se refieren a los DAMPs como análogos de las alarminas, diferenciándolos de los PAMPs, por no ser productos endógenos.

alarminas. Esto permite entender el rol de las alarminas en las patologías antes mencionadas.

El tipo de muerte celular no es el único factor que regula la bioactividad y disponibilidad de las alarminas. Diferentes tipos de estrés celular (ej: radiación UV, toxinas, estrés inflamatorio, estrés metabólico) son capaces de inducir la liberación de ciertas alarminas sin ocasionar necesariamente la muerte celular (Rider *et al.*, 2017). Se sabe que esta liberación de las alarminas, sin muerte celular evidente, puede ser llevada a cabo por una secreción no canónica, como el transporte a través de lisosomas y otras vesículas (Murray and Stow, 2014; Kim *et al.*, 2020). Asimismo, se continúan investigando nuevas rutas o mecanismos de liberación de las alarminas, siendo la liberación con microvesículas una de las vías más relevantes (Kim *et al.*, 2020). Por otro lado, ciertas modificaciones postraduccionales son claves para regular la disponibilidad y actividad de las alarminas. Es así como ciertas proteasas, fosforilasas, oxidasas, y acetilasas han sido reconocidas como fundamentales en la localización celular y activación de las alarminas (Rider *et al.*, 2017).

Una curiosidad relevante sobre las alarminas es su expresión en células que conforman las diferentes barreras tisulares, en especial su expresión es constitutiva en epitelios y endotelios. Es decir, tejidos donde el daño celular se puede interpretar como una alarma fisiológica frente invasiones con patógenos (Martin and Martin, 2016).

Otro factor importante en la bioactividad de las alarminas es su localización. Es importante señalar que algunas de las alarminas (IL-33, IL-1 α , HMGB1, etc) presentan localización nuclear. Varias de las funciones en el núcleo son aún desconocidas, pero en algunos casos se ha podido demostrar que estas alarminas regulan la expresión de ciertos genes, y son relevantes en mediar efectos antiinflamatorios o de reparación del ADN. También se ha propuesto que algunas alarminas, como las Histonas, el HMGB1, e IL-33 sean consideradas como sensores de daño al ADN o a cambios de la cromatina frente a eventos de toxicidad o estrés celular. De esta forma, su liberación respondería a daños frente a este tipo de eventos (Rider *et al.*, 2017).

Por lo tanto, estos factores son un conjunto de señales que presentan mecanismos de inducción, liberación y activación particulares del tejido, el estímulo liberador y de la propia alarmina. Por esta razón, a continuación, se describirán las características individuales de las alarminas estudiadas.

4.1.1 IL-33

La IL-33 es una proteína de aproximadamente 30-36 kDa, miembro de la familia de la IL-1. Su expresión es constitutiva en algunas células, entre ellas: epiteliales, endoteliales y fibroblastos (Moussion, Ortega and Girard, 2008). Esta alarmina se localiza preferentemente en el núcleo, donde actuaría como un regulador de ciertos factores de transcripción, entre ellos, el NF-kB (Martin, 2013). Sin embargo, se estima que puede tener funciones en la regulación génica desconocidas. Su expresión se puede modular por variedad de condiciones y estímulos proinflamatorios. Por ello, se comprende que se la haya relacionado con gran cantidad de patologías: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Artritis Reumatoide, infecciones, enfermedad de injerto contra huésped (Duan *et al.*, 2013; Reichenbach *et al.*, 2015; Martin and Martin, 2016).

Además de sus funciones nucleares, la IL-33 liberada en el medio extracelular se une a su receptor de membrana, el IL-33R. Esta proteína es un heterodímero conformado por dos proteínas transmembrana: la proteína ST2L (también conocida como: IL33R α , IL-

1R4, T1L, Der-4 o IL-1RL1) y el IL-1R3 (también conocida como: IL33R β , IL1RAP, C3orf13, IL-1RAcP). En este complejo, la unión con IL-33 es mediada por ST2L, mientras que la otra cadena proteica es solamente necesaria para inducir la señal intracelular dependiente del Mydosoma. Este último es un complejo proteico de señalización intracelular conformado por MyD88-IRAK4-TRAF6 (Martin, 2013). Una vez conformado dicha estructura, se activan diferentes vías intracelulares: AP-1, NF-kB, JNK, ERKs, MAPKs e STATs/IRFs. Dichas vías no parecen diferir de las inducidas por el IL-1R (Martin and Martin, 2016).

Curiosamente, la IL-33 presenta un comportamiento correspondiente a una citoquina clásica, como también al de una alarmina (Martin and Martin, 2016). Esta dualidad se debe a que, en ciertas células viables, su secreción puede ser mediante un mecanismo de secreción activa no canónica (Martin and Martin, 2016). Por ahora, se desconoce cuáles son los mecanismos relacionados con este proceso, pero si ha comprobado que se requiere de su acumulación en citoplasma (Kakkar *et al.*, 2012). Los demás mecanismos de liberación involucran la muerte celular programada, concretamente, la necroptosis (Shlomovitz *et al.*, 2019), la piroptosis (Bernard *et al.*, 2018) y la ferroptosis (Martin-Sanchez *et al.*, 2017). Los primeros dos procesos celulares logran liberar la IL-33 al medio extracelular por medio de la formación de poros en la membrana citoplasmática. Dichas estructuras están conformadas por la proteína MLKL fosforilada, o por la porción N-terminal de la Gasdermina D, respectivamente (Tang *et al.*, 2019). Mientras que en el caso de la ferroptosis aún se desconoce el mecanismo.

Enzima	Lugar de Corte (AA)	Fragmentos (Aprox. kDa)	Bioactividad Relativa	Referencia
Elastasa de neutrófilos	99 (*ISGVQ)	19.6	+++	(Lefrançois <i>et al.</i> , 2012)
Catepsina G	95 (*FAFG); 109 (*LHD)	20 y 18	+++	(Lefrançois <i>et al.</i> , 2012)
Quimasa	95 (*FAFG); 109 (*LHD)	20 y 18	+++	(Lefrançois <i>et al.</i> , 2014)
Triptasa	72(*KTGR); 79 (*RHLVL); 107 (*RALH)	22-18	+++	(Lefrançois <i>et al.</i> , 2014)
Granzima B	111(*SSIT)	18	+++	(Lefrançois <i>et al.</i> , 2014)
Caspasa 3/7	178 (DGVD*)	10 (C-Term) y >25 kD (N-Term)	-	(Lüthi <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 12-Fragmentos generados por digestión enzimática de IL-33. Se indican los diferentes fragmentos proteicos derivados del clivaje enzimático de IL-33. El lugar de corte se indica con la posición del aminoácido donde se realiza el corte indicado con "*" y la secuencia inmediata. Los pesos moleculares corresponden a los fragmentos detectables con anticuerpos dirigidos contra la

región C-Terminal (posiciones 112-270) de la proteína. Estos pesos son derivados de cálculos de pesos por secuencia y corroborados con datos bibliográficos indicados en la columna de referencias. La bioactividad es meramente indicativa de lo descrito en la bibliografía y está relativizada a la actividad de la proteína full o completa. Sin embargo, solo ha sido estudiada en una cantidad acotada de células y modelos.

Al igual que ocurre con otras alarminas, la actividad biológica de IL-33 no solo depende de su liberación al medio extracelular, sino también de ciertas modificaciones postraduccionales, en particular, la oxidación y el clivaje por proteasas (Martin and Martin, 2016). Se ha comprobado que las especies reactivas del oxígeno (ROS) inhiben la bioactividad de esta alamina al rompen un puente disulfuro ubicado en una región crítica para su unión con el IL-33R (Cohen *et al.*, 2015). Por otro lado, esta proteína presenta varios sitios de corte por proteasas (**Tabla 12**) (Martin, 2013). Dependiendo el sitio de corte enzimático, la IL-33 modifica drásticamente su afinidad por el ST2L. De esta forma, las caspasas 3 y 7, activas durante procesos apoptóticos, cortan a la IL-33 en fragmentos carentes de cualquier tipo de bioactividad. Es importante notar que los fragmentos generados durante este proceso presentan una masa molecular superior a los 25 kDa, y otros inferiores a los 10 kDa (Lüthi *et al.*, 2009). En conclusión, una célula que inicia el proceso de apoptosis degrada a la IL-33 intracelular evitando la liberación de su forma bioactiva. A pesar de lo mencionado, existe un conjunto de proteasas capaces de cortar la IL-33 en regiones donde los productos resultantes presentan actividades significativamente superiores a la forma completa o “Full-length” (Lefrançais *et al.*, 2012; Lefrançais *et al.*, 2014). En estos casos, las masas de los fragmentos de IL33 varían entre los 18 y 21 kDa, y algunos autores se refieren a los mismos como versiones “maduras”. Las enzimas responsables de este fenómeno son: la granzima B, la elastasa de neutrófilos, la tripsina de mastocitos y la catepsina G. Además, ciertas proteasas liberadas por diversos microorganismos patogénicos también presentan la capacidad de generar los fragmentos de 18-21 kDa (Cayrol *et al.*, 2018). De esta forma, la bioactividad de la IL-33 puede verse intensamente modificada en presencia de ciertos eventos inflamatorios. Por todo esto, es comprensible que esta proteína cumpla roles tan complejos y diversos dependiendo del entorno donde se libera.

El sistema de IL-33, es aún más complejo si se considera que el gen IL-1RL1, que codifica para el ST2L, es capaz de producir una variante por empalme alternativo denominada ST2s (Martin, 2013). Dado que esta variante no presenta la porción transmembrana e intracelular de la proteína ST2L, no es una proteína anclada a membrana, si no soluble. De este modo, el ST2s es secretado al medio extracelular desde donde es capaz de unirse a la IL-33 libre e impedir su unión al IL-33R. Por ello, el ST2s es un componente regulatorio del eje IL-33/ST2 (Martin, 2013; Martin and Martin, 2016).

Las diferentes funciones de la IL-33 dependerán del tipo de célula que presente su receptor IL-33R, y del ambiente extracelular al cual estas células están sometidas (Molofsky, Savage and Locksley, 2015). Además, la IL-33 puede inducir diferentes tipos de respuestas al actuar sobre distintos perfiles de células T. De este modo, IL-33 puede presentar un rol pro-Th2 (Schmitz *et al.*, 2005), pro-regulatoria (Schiering *et al.*, 2014), pro-Th1 (Bonilla, Frohlich, *et al.*, 2012; Baumann, W. V Bonilla, *et al.*, 2015) y/o pro-citotóxica (Yang *et al.*, 2011). Esta gran variedad de respuestas se debe a que el receptor IL-33R es expresado por células Th2 de forma constitutiva (Schmitz *et al.*, 2005), pero también en ciertas poblaciones de células Tregs en el intestino (Schiering *et al.*, 2014). Asimismo, algunas células Th1 y linfocitos T CD8⁺ citotóxicos pueden expresar este receptor de forma transitoria en el contexto de respuestas tipo 1, donde IL-33 favorece el

fenotipo citotóxico y productor de IFN γ (Yang *et al.*, 2011; Alvarez, Fritz and Piccirillo, 2019). También se ha demostrado que la IL-33 es capaz de activar células de la inmunidad innata. En este sentido, se destaca su rol promotor de la respuesta proinflamatoria en células NK estimulando la expresión de IFN γ y moléculas citotóxicas (Smithgall *et al.*, 2008). Además, esta alarmina actúa sobre las Células Linfoides Innatas tipo 2 (ILC-2), las cuales presentan una elevada expresión constitutiva del IL-33R, y generan respuestas reparadoras del tejido mediante la secreción de anfiregulina (Monticelli *et al.*, 2015), como también mediante respuestas inflamatorias de tipo 2, mediante la secreción de citoquinas como IL-5 e IL-13 (Lott *et al.*, 2015).

A su vez, IL-33 es capaz de mediar la activación del endotelio en situaciones inflamatorias (Choi *et al.*, 2009; Demyanets *et al.*, 2011), en especial, se ha observado su rol en promover el infiltrado de neutrófilos en articulaciones afectadas en Artritis Reumatoidea (Verri *et al.*, 2010). A pesar de estas funciones pro-inflamatorias, la IL-33 presenta actividades de reparación y promoción de la respuesta tolerogénica, por ejemplo, actuando sobre células dendríticas intestinales promoviendo la expresión de IL-2, y la inducción de respuestas mediadas por células Tregs (Matta *et al.*, 2014). Asimismo, esta alarmina está implicada en la estimulación de la proliferación epitelial (Islam *et al.*, 2016), en la reparación de heridas mediante su actividad sobre miofibroblastos y macrófagos (Millar *et al.*, 2017), así como un rol protector sobre el epitelio intestinal al estimular la producción de péptidos antimicrobianos por los enterocitos (Xiao *et al.*, 2019).

Las diversas funciones de IL-33, en algunos casos opuestas, pueden interpretarse en base al modelo propuesto por Molofsky y col. (Molofsky, Savage and Locksley, 2015). Este modelo describe que las acciones biológicas de IL-33 son, en parte, consecuencia de su procesamiento, pero también de la existencia de otras citoquinas, entre ellas el IFN γ e IL-23, que regulan la actividad de las células IL-33R⁺. Además, el modelo considera que la respuesta depende del tipo celular predominante que expresa el IL-33R (Molofsky, Savage and Locksley, 2015). De esta forma, señales como el IFN γ son consideradas inhibitorias de la actividad pro-Th2 de la IL-33, particularmente al actuar sobre las células ILC-2 (Molofsky *et al.*, 2015). Además, la IL-23a es capaz de inhibir la expresión de ST2L en las células Treg, inhibiendo la capacidad pro-regulatoria de esta alarmina (Schiering *et al.*, 2014). A su vez, la cantidad relativa de los receptores ST2s/ST2L condiciona la respuesta del tejido a la IL-33, como también el hecho de que ST2L puede inducirse en poblaciones de linfocitos T de tipo Th1 y T CD8⁺ citotóxicos (Yang *et al.*, 2011; Bonilla, Fröhlich, *et al.*, 2012; Baumann, W. V. Bonilla, *et al.*, 2015). La **Figura 6** muestra los aspectos centrales de la biología de IL-33.

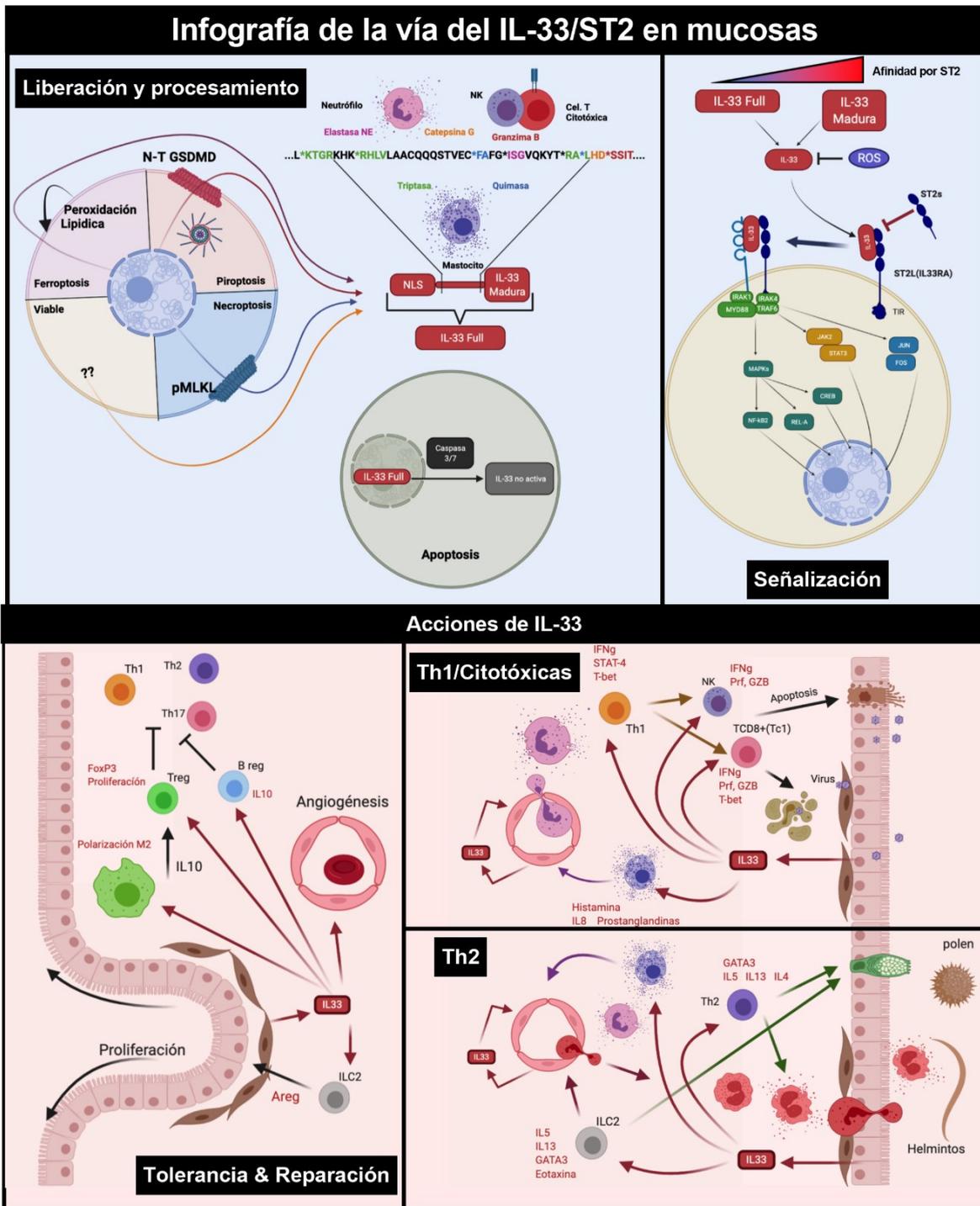


Figura 6-Infografía resumen del eje IL-33/ST2 en mucosas. La descripción se encuentra en el texto de la sección. Acrónimos: NT-GSDMD: Fragmento N terminal Gasdermina D, pMLKL: fosfo-MLKL, NLS: secuencia de localización nuclear, ROS: Especies reactivas del oxígeno; Prf: Perforina 1, GZB: Granzima B.

4.1.2 IL-1 α

La IL-1 α es una proteína de 217 aminoácidos y aproximadamente 29-31 kDa. Esta proteína es parte de en la familia de la IL-1, ya que contiene la secuencia “AXD” cerca de su zona de corte enzimático (Mantovani *et al.*, 2019). La IL-1 α parece haberse originado cuando su gen se duplico del gen *IL1B*, hace unos 320 o 160 millones de años (Rivers-Auty *et al.*, 2018). A pesar de tener a la IL-1 β como antepasado, presenta un patrón de expresión muy diferente, localizándose particularmente en: queratinocitos de la piel, células epiteliales tipo 2 del pulmón, astrocitos del sistema nervioso central y gran parte de células mesenquimales, epiteliales y mieloides del tejido linfoide, mucosas y los testículos (Mantovani *et al.*, 2019). Su expresión es usualmente constitutiva, pero puede ser inducida por diferentes situaciones: estrés metabólico (Rosa *et al.*, 2008), aterosclerosis (Freigang *et al.*, 2013), inflamación aguda y eventos de oxidación celular (Rider *et al.*, 2017).

La localización de IL-1 α es comúnmente nuclear, lo cual es explicado por la presencia del NLS (LKKRRL) cerca de la porción N-terminal (Wessendorf *et al.*, 1993). Sin embargo, también se puede localizar en el citoplasma e incluso en la membrana plasmática. La IL-1 α presenta una rápida migración del citoplasma al núcleo, no obstante, ambos compartimentos la pueden acumular selectivamente en diferentes condiciones. De esta forma, durante un proceso apoptótico, la IL-1 α es reclutada en el núcleo, evitando su acumulación en el citoplasma, lo que reduce su disponibilidad extracelular (Cohen *et al.*, 2010). Por otro lado, en condiciones inflamatorias la IL-1 α suele localizarse en el citoplasma (Cohen *et al.*, 2010; Mantovani *et al.*, 2019). Esta localización explica su rápida liberación durante eventos de muerte celular como necroptosis y piroptosis. Por esta razón, IL-1 α es considerada una alarmina.

Enzima	Secuencia	Fragmento (N-ter)	Fragmento (C-ter)	Referencia
Elastasa de neutrófilos	103 (*IAND)	11.08 kD	19.55 kD	(Afonina <i>et al.</i> , 2015)
Granzima B	103 (IAND*)	11.5 kD	19.13 kD	(Afonina <i>et al.</i> , 2011)
Quimasa	118 (APFSF*)	13.22 kD	17.41 kD	(Afonina <i>et al.</i> , 2015)
Caspasa 5	103 (IAND*)	11.5 kD	19.13 kD	(Wiggins <i>et al.</i> , 2019)
Calpaina	118 (APFSF*)	13.22 kD	17.41 kD	(Carruth, Demczuk and Mizel, 1991; Afonina <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 13- Resumen de sitios de corte enzimático de IL-1 α . Se muestran el sitio en la secuencia donde se produce en corte enzimático “*” por las enzimas mencionadas, los pesos moleculares calculados de los productos de digestión y las referencias bibliográficas.

De forma análoga a la IL-33, la IL-1 α completa (también denominada “Pro-IL-1 α ”) es susceptible a clivaje por proteasas (Tabla 13). Si bien a diferencia de la Pro-IL-1 β , la Pro-IL-1 α es capaz de unirse y activar su receptor de membrana, el IL-1R, ciertos cortes enzimáticos aumentan su afinidad (Kim *et al.*, 2013). Entre las proteasas involucradas en este proceso, la calpaina es una de las más estudiadas. Dependiendo de la concentración

de Ca²⁺ citoplasmático, la calpaína corta a la IL-1 α intracelular transformándola en una versión madura, de 17 kD, con mayor bioactividad (Carruth, Demczuk and Mizel, 1991; Afonina *et al.*, 2015). Otras enzimas extracelulares, como granzima B, catepsina G, la elastasa de neutrófilos y la quimasa generan versiones de entre 19 y 17 kD con mayor bioactividad que la versión completa (**ver Tabla 13**) (Carruth, Demczuk and Mizel, 1991; Afonina *et al.*, 2015; Wiggins *et al.*, 2019).

La IL-1 α también presenta una vía de señalización única dentro de la familia de las IL-1, la cual depende de su localización en membrana plasmática. Este mecanismo ha sido observado en fibroblastos, células endoteliales y particularmente en macrófagos en enfermedades granulomatosas (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016). Desde esta ubicación, la pro-IL-1 α es capaz de interactuar con el IL-1R presente en células adyacentes, mecanismo conocido como “juxta-parácrino” (Kurt-Jones, Kiely and Unanue, 1985). Aunque se desconoce cómo se regula la localización de la pro-IL-1 α en la membrana, se sabe que este proceso depende de glicosilaciones con D-manosa y/o por modificaciones con lípidos (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016; Chan *et al.*, 2020).

La IL-1 α presenta un complejo sistema de receptores y proteínas inhibitorias. El IL-1R es el receptor de membrana de la IL-1 α , el cual es compartido con la IL-1 β . Éste está conformado por un heterodímero, con una subunidad con gran afinidad por la IL-1 α , el IL-1R1 y una proteína accesoria, IL-1R3 (también conocida como IL-1RAcP o IL1RAP). La cadena IL-1R1 presenta dominios intracelulares TIR (“Toll-IL-1 resistance”). De esta forma, IL-1 α se une a IL-1R que posteriormente dimeriza con el IL-1R3 mediante los dominios TIR, que permite reclutar a MyD88, y comenzar el ensamblado del denominado Mydosoma. Finalmente, este complejo activa diferentes vías, como: AP-1, NF- κ B, JNK, ERKs, MAPKs e STATs/IRFs (Dinarello, 2009).

La evolución parece haber creado muchos puntos de control en la señalización mediada por la IL-1 α . Esto puede entenderse ya que la administración de IL-1 α o su liberación por células necróticas, inducen respuestas proinflamatorias locales con grandes acúmulos de neutrófilos activados (Di Paolo *et al.*, 2014). Por ello, se comprende que exista una versión soluble del receptor, denominada sIL-1Rs, la cual es capaz de bloquear la señalización de la IL-1 α al competir con el receptor de membrana (Symons, Young and Duff, 1995). También existe otra proteína soluble inhibitoria del IL-1R, codificada por el gen *IL-1RN*, conocida como receptor antagonista de IL-1, o simplemente IL-1RA (Arend, 1991). Por último, la IL-1R2 bloquea diferentes puntos de la señalización intracelular de la IL-1 α . Primeramente, la IL-1R2 es capaz de unirse a la IL-1 α citosólica, y al hacerlo, enmascara su señal NLS. Esto permite acumular a la Pro-IL-1 α en el citoplasma. Al mismo tiempo, este proceso evita tanto la liberación de pro-IL-1 α al medio extracelular, como también evita el clivaje por la calpaína. Sin embargo, durante la piroptosis, la caspasa 1 activa es capaz de degradar al IL-1R2, lo que permite la maduración de la pro-IL-1 α mediada por la calpaína (Zheng *et al.*, 2013). Además, la muerte celular ocasionada por piroptosis permite que la pro-IL-1 α sea liberada al medio extracelular. Por otro lado, la IL-1R2, también puede ser liberada al medio extracelular desde donde es capaz de bloquear la unión de IL-1 α y su receptor (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016). No obstante, investigaciones recientes han descubierto que el IL-1R2 sería necesario para la localización en membrana de la pro-IL-1 α (Chan *et al.*, 2020). Esto sugiere que el IL-1R2 no solo actuaría como un inhibidor de la actividad de IL-1 α sino también como un agente promotor de su localización en membrana.

Una vez en el medio extracelular, la pro-IL-1 α o sus versiones maduras son capaces de promover la respuesta proinflamatoria en diferentes tejidos dependiendo de la expresión

del IL-1R (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016). Entre las células que expresan su receptor se encuentran principalmente los neutrófilos, y en menor medida las células T CD4⁺ (efectoras o de memoria), células T CD8⁺, monocitos, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016; Mantovani *et al.*, 2019).

Las actividades de la IL-1 α pueden ser categorizadas en 4 grupos. La primera es como inductor de la proliferación celular de la médula ósea denominada “hematopoyesis de emergencia”. Esta respuesta es evidente en patologías o condiciones donde hay un recambio celular acelerado: envejecimiento, infecciones crónicas o agudas, radioterapia, quimioterapia, entre otras. En estas circunstancias, la IL-1 α o la IL-1 β estimulan la producción de células mieloides, en especial de granulocitos como los neutrófilos (Pietras *et al.*, 2016). La segunda función es amplificar respuestas inflamatorias. La IL-1 α es usualmente inducida en varias respuestas inflamatorias, en respuesta a estímulos de los PRRs, estrés metabólico, ácidos grasos en placas ateromatosas, estrés oxidativo y la necrosis celular. En estas situaciones, la IL-1 α ya sea, liberada y/o acumulada en la membrana, logra estimular la producción de más IL-1 α e IL-1 β . Siendo éste un mecanismo de auto-amplificación (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016). Curiosamente, se cree que la IL-1 β es capaz de inducir un control más activo sobre la producción de la IL-1 α , que la IL-1 α sobre IL-1 β . Experimentos en ratón confirman la reducción de la producción de IL-1 α en ratones *il1b*-KO (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016; Mantovani *et al.*, 2019). La tercera función es la capacidad de estimular las de células en respuestas tipo 1, en particular las células T CD8⁺ efectoras. Esto se basa en que tanto IL-1 α como IL-1 β son capaces de inducir un fenotipo presentador de las células dendríticas capaz de estimular la producción de células T CD8⁺ contra antígenos virales (Pang, Ichinohe and Iwasaki, 2013). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de IL-1 α en membrana promueve la respuesta antitumoral dependiente de las células NK IFN γ ⁺, y células T CD8⁺ efectoras productoras de IFN γ (Lin *et al.*, 2016; Udagawa *et al.*, 2021). Esto permite suponer un rol importante de IL-1 α en la inducción de respuestas citotóxicas. También se ha visto que células T de tipo Th1 y Th17 (en menor medida Th2) son fuertemente estimuladas en presencia de IL-1 α/β (Ben-Sasson *et al.*, 2009; Santarlasci *et al.*, 2013). De hecho, la presencia de IL-1 α o IL-1 β , es relevante para evitar la supresión de las Tregs sobre diferentes células T efectoras (Schenten *et al.*, 2014). Asimismo, otras investigaciones indicarían un rol promotor específico de IL-1 α en las respuestas pro-Th17 (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2019). La cuarta función está relacionada a la capacidad de regulación respuestas inflamatorias de forma local. Esto refiere al hecho que la concentración libre de IL-1 α es extremadamente baja, independientemente de la enfermedad o situación que evaluemos, y en presencia o no de su inducción. Esto ha llevado a pensar que la IL-1 α actúa principalmente de forma local (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016). De esta manera se ha planteado que la IL-1 α es capaz de inducir la activación del endotelio, epitelio, fibroblastos y macrófagos para reclutar neutrófilos, y promover respuestas locales, no sistémicas.

En conjunto, esta información permite considerar a la IL-1 α como una proteína con función doble, actuando como una citoquina y una alarmina en diferentes contextos. La IL-1 α es producida constitutivamente por diferentes células, pero es liberada, o localizada en membrana, en condiciones de estrés inflamatorio. A su vez, si las condiciones son adecuadas, (ej. infección bacteriana) la activación del inflamasoma o la caspasa 11 (caspasa 4/5 en humanos) libera IL-1 α/β al ambiente extracelular. Esto induce la producción de más IL-1 α tanto local como sistémicamente. Consecuentemente, este evento activa células locales de la inmunidad innata como los macrófagos confiriéndole

capacidad microbicida e iniciando el reclutamiento de células granulocíticas y linfoides. Al mismo tiempo, las células granulocíticas infiltrantes secretan ciertas enzimas proteolíticas que confieren una mayor actividad a la IL-1 α . De este modo, se potencia la bioactividad de la IL-1 α , la cual logra estimular nuevas poblaciones de células T efectoras, y a células estromales alimentando a la respuesta inflamatoria local. Si bien este proceso se puede inhibir frente a la eliminación de evento iniciador, en el corto plazo se habrá generado una inflamación local en el tejido afectado. Esto resultaría beneficioso en condiciones de infecciones virales o bacterianas, pero contraproducente para enfermedades inflamatorias crónicas, o episodios de sepsis (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016).

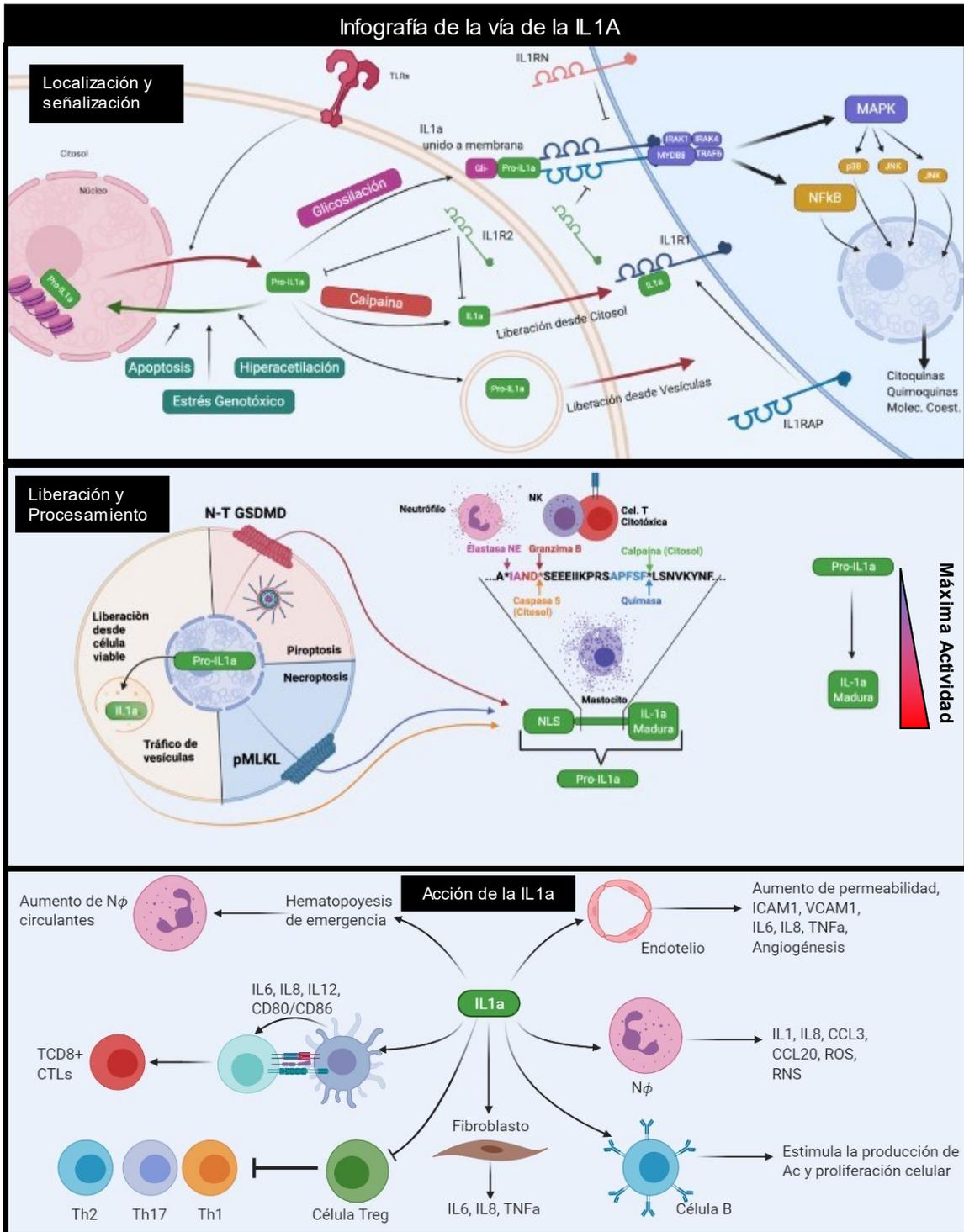


Figura 7- Infografía de la alarmina IL-1 α . Se muestra un resumen de los diferentes aspectos bilógicos comentados en la introducción sobre la vida de esta alarmina. RNS: especies reactivas del nitrógeno. N ϕ : neutrófilos.

4.1.3 HMGB1

La proteína “high-mobility group box 1” (HMGB1) es parte de la familia HMG o “high mobility group” conformada por proteínas de unión a la cromatina con gran velocidad de corrida electroforética (Goodwin, Sanders and Johns, 1973). Particularmente, la HMGB1 es una proteína del grupo “Box1”, que refiere a un motivo estructural capaz de unirse al ADN. La HMGB1 es una proteína de 25 kDa, que presenta dos dominios N-terminales de tipo “HMG-box” cargados positivamente, capaces de unirse al surco menor del ADN (Ranzato, Martinotti and Patrone, 2015). Dentro del primer dominio caja o “box” se encuentra una secuencia NLS, rica en lisina, lo que permite su localización nuclear (Ranzato, Martinotti and Patrone, 2015). La porción C-terminal presenta una cola cargada negativamente o “ácida”. Esta estructura hace posible la interacción de HMGB1 con multitud de proteínas, las cuales presentan diversas funciones nucleares, y también permite la interacción de HMGB1 con varios receptores de membrana (Ranzato, Martinotti and Patrone, 2015).

La HMGB1 nuclear cumple diversas funciones relacionadas con la organización del ADN y su reparación. De hecho, se la ha involucrado en diversos procesos de reparación del ADN, y su ausencia se relaciona con una mayor inestabilidad cromosómica (Yuan *et al.*, 2004; Ranzato, Martinotti and Patrone, 2015).

Si bien su localización primordial es nuclear, se la puede encontrar en el citoplasma de las células productoras de forma difusa. La localización intracelular del HMGB1 depende de modificaciones postraduccionales intracelulares, particularmente la acetilación, metilación y oxidación. A pesar de ello, no se conoce si la HMGB1 puede tener otras modificaciones menos estudiadas: fosforilación, y alquilaciones (Ranzato, Martinotti and Patrone, 2015).

En cuanto a la acetilación, se ha confirmado que la HMGB1 hiper-acetilada migra al citosol desde donde puede ser liberada al medio extracelular por medio de una forma activa y otra pasiva (Scaffidi, Misteli and Bianchi, 2002). La forma pasiva se relaciona con necrosis celular, y la activa engloba mecanismos de muerte celular regulada como: apoptosis (Bell *et al.*, 2006), necroptosis (Zhang *et al.*, 2014; Negroni *et al.*, 2017) y piroptosis (Lu *et al.*, 2013), pero también a un mecanismo de liberación por células viables mediante lisosomas o microvesículas (Xu *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2020). Análogamente a la IL-33 y la IL-1 α , la HMGB1 pierde su bioactividad al ser liberada por células apoptóticas. Dicho proceso de liberación solo se logra si esta proteína se encontraba en el citoplasma, mientras que su versión unida a la cromatina no es liberada. Curiosamente, la HMGB1 liberada por procesos apoptóticos se encuentra oxidada en residuos de Cys en las posiciones 23, 45 y 106. Se piensa que la versión oxidada “oxHMGB1” es necesaria para inducir repuestas tolerogénicas por células presentadoras de antígenos (Kazama *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, la oxHMGB1 es incapaz de unirse a los receptores de membrana (Kazama *et al.*, 2008) involucrados en la secreción de citoquinas proinflamatorias (ver más adelante). También se ha sugerido que la HMGB1 liberada por cuerpos apoptóticos sería una versión inactiva de menor masa debida al corte enzimático por factores del complemento (como C1s) (Yeo *et al.*, 2016). En los mecanismos de muerte proinflamatorios, la HMGB1 liberada se encuentra principalmente acetilada. Tal es la importancia de este hallazgo, que la “acHMGB1” en suero considerada un marcador indirecto de procesos piroptóticos en enfermedades como la hepatotoxicidad con acetaminofén y es un útil marcador del progreso de esta enfermedad (Zamora *et al.*, 2019).

La HMGB1 es capaz de unirse a receptores no exclusivos de esta proteína como el TLR4 (Yang *et al.*, 2010), o el Receptor de Productos Avanzados de Glicación (RAGE) (Kokkola *et al.*, 2005). Estas interacciones requieren de la cola ácida C-terminal y de un estado no completamente oxidado de los residuos de Cys. Particularmente, se requiere de la presencia de un puente disulfuro entre las Cys23 y Cys45 (Yang *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2014). La unión de HMGB1 a TLR4, que no compite con el LPS, estimula la producción de citoquinas (Yang *et al.*, 2010). De hecho, HMGB1 es capaz de unirse al LPS y transportarlo hasta el TLR4, logrando una unión más eficiente. Por otro lado, RAGE es un receptor expresado por diferentes tipos celulares: vasculares, epiteliales, inmunes, cardiomiocitos, entre otros (Egaña-Gorroño *et al.*, 2020). Este receptor no es específico de HMGB1, sino que une distintos ligandos como: productos de glicosilación avanzada tanto proteicos y/o lipídicos “AGE” (relevantes en los procesos proinflamatorios en pacientes diabéticos), las proteínas S100, el ácido lisofosfatídico (LPA), oligómeros de los péptidos mieloides beta ($A\beta$) y el polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos (islet amyloid polypeptide o “IAPP”) (Egaña-Gorroño *et al.*, 2020). La interacción de HMGB1 con RAGE, produce activación de las vías de señalización como: NF- κ B, MAPKs, PI3K/Akt, Rho GTPases, Jak/STAT, IRFs, y la familia de proteínas Src. Esta multiplicidad de vías activadas conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias y enzimas pro-oxidativas. RAGE también tiene dos versiones que compiten por los ligandos. La primera es llamada sRAGE, y se genera a partir del corte enzimático de la versión en membrana por metaloproteasas, como la ADAM10. La otra proteína se denomina esRAGE la cual es el producto de un empalme alternativo del gen *AGER* (productora de RAGE). En ambos casos, las variantes solubles funcionan como inhibidores de la señalización por el receptor de membrana (Kierdorf and Fritz, 2013; Egaña-Gorroño *et al.*, 2020).

Se ha sugerido que HMGB1 puede interactuar también con TLR2/9, TREM, CXCR4, IL-1R, entre otros (Sims *et al.*, 2010). Sin embargo, se cree que no es la proteína HMGB1 la que media esta interacción directamente, sino que serían otras moléculas capaces de unirse al HMGB1. Esto último, se debe a la gran capacidad del HMGB1 para unirse a otras moléculas como: ADN, ARN, histonas, nucleosomas, LPS, CXCL12, IL-1 α , IL-1 β , entre otras. En estos casos, HMGB1 puede actuar como una proteína transportadora de estas moléculas para aumentar la eficiencia del reconocimiento por los receptores específicos (Andersson, Yang and Harris, 2018). A su vez, la interacción RAGE-HMGB1-“Molécula agonista” permite una endocitosis del complejo y su posterior incorporación en lisosomas. Desde allí, la HMGB1 es capaz de liberar la molécula agonista transportada al citosol celular. Esta liberación intracelular de la molécula terminaría activando a los receptores específicos intracelulares (Andersson, Yang and Harris, 2018). Este fenómeno es relevante si se considera a la HMGB1 como una lamina liberada al medio extracelular en condiciones de inflamación tisular, en donde, HMGB1 puede unirse a PAMPS, logrando con ello amplificar las respuestas inflamatorias locales. Este mecanismo es relevante en ciertas situaciones como la sepsis. Aquí, el HMGB1 es un mediador tardío fundamental en la falla de órganos sistémica y la pérdida de permeabilidad epitelial (Liu *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2018). Tal es el caso, que se han documentado mejoras notables en pacientes sépticos tratados con anticuerpos anti-HMGB1 (Andersson, Yang and Harris, 2018). Asimismo, el proceso de falla de órganos que ocurre durante una sepsis se cree que involucra la activación intracelular de la caspasa 4/5 (caspasa 11 en ratón) por medio de LPS. Ciertas evidencias indican que el LPS sería introducido al citosol por medio de dicho mecanismo (Deng *et al.*, 2018).

Otra de las funciones del HMGB1 es mediar la activación de la respuesta inmune adaptativa. Se observó que las células dendríticas expuestas al HMGB1 presentan una maduración acelerada y expresan proteínas inflamatorias: RANTES, IL-1 α , IL-12, e IL-2. Este conjunto de citoquinas es capaz de inducir de un fenotipo Th1 en células T activadas (Messmer *et al.*, 2004; Rovere-Querini *et al.*, 2004). Curiosamente, la vía de JAK/STAT1, activada por interferones tipo I y II (asociadas al perfil Th1), induce la acetilación del HMGB1 (Lu *et al.*, 2014). Este fenómeno logra localizar al HMGB1 en el citoplasma y favorece su liberación (Lu *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, el HMGB1 es capaz de inducir piroptosis en macrófagos mediante la lisis de la membrana lisosomal. Dicho proceso libera catepsina-B al citosol, lo que activa al inflamasoma NLRP3 y ocasiona la piroptosis, con la consecuente liberación de alarminas y citoquinas IL-1 β e IL-18 (Xu *et al.*, 2014). De esta forma, este tipo de muerte celular logra liberar más HMGB1 al ambiente. Este HMGB1 es capaz de unirse a ADN y ARN circulantes, formando complejos ADN/ARN-HMGB1, los cuales, al ser internalizados inducen una fuerte respuesta de IFNs tipo I por medio de receptores vesiculares/citosólicos (Harris, Andersson and Pisetsky, 2012). Debido a estas propiedades, se considera al HMGB1 un factor importante en infecciones virales (Wang *et al.*, 2006) y otras respuestas inmunes de tipo 1 (Andersson, Yang and Harris, 2018). Asimismo, HMGB1 es capaz de polarizar macrófagos a un fenotipo M1 mediante un mecanismo de activación del inflamasoma AIM2 dependiente de TLR4 y RAGE, actuando como una potente alarmina (Wang *et al.*, 2020). Además, HMGB1 actúa induciendo la proliferación en poblaciones de células T CD8⁺ por medio de su unión con RAGE (Sundberg *et al.*, 2009). A su vez, HMGB1 promueve la respuestas inflamatorias en diferentes mucosas mediante la inhibición de las uniones estrechas de las células epiteliales, y endoteliales (Huang *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha observado que esta alarmina promueve la actividad supresora de células Treg (Schuler *et al.*, 2012), e induce respuestas de Tipo 2 en contextos alérgicos (Ma *et al.*, 2015). Por todo ello, es claro que HMGB1 presenta un gran impacto sobre diferentes células del sistema inmune. En la **Figura 8**, se indican las funciones más importantes que hemos mencionado.

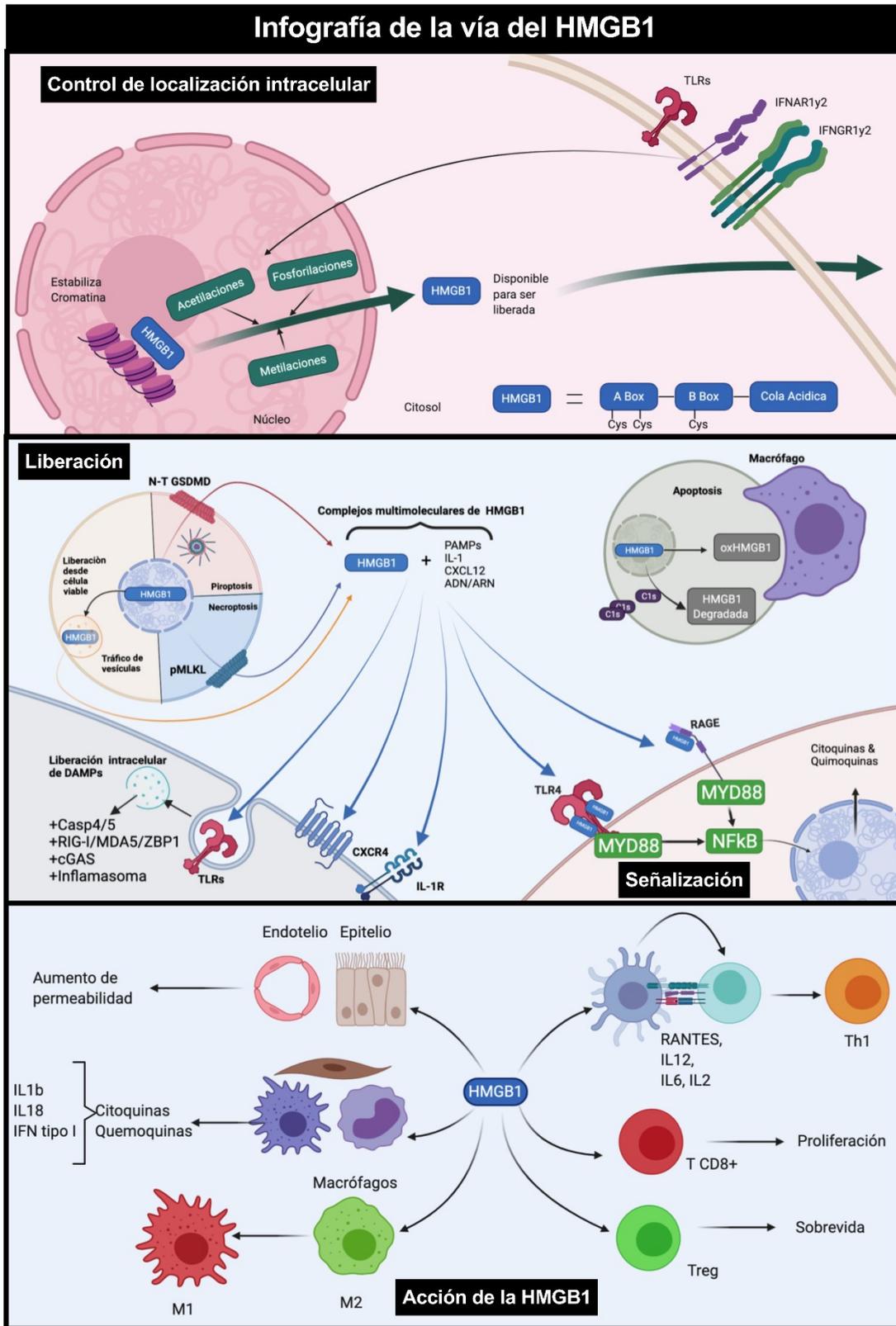


Figura 8- Infografía de la alarmina HMGB1. Se muestra un resumen de los diferentes aspectos biológicos de esta alarmina. Nota: el símbolo “+” simboliza activación o unión de factores.

4.2 Justificación e hipótesis general sobre las potenciales relaciones entre los ejes IL-33, IL-1 α , HMGB1 y la Enfermedad Celíaca

En esta subsección se describen las causas y potenciales implicaciones de las alarminas mencionadas en la enfermedad celíaca y en general en el entendimiento de su rol en patologías intestinales.

Como se comentó en la introducción general, y en el anexo del modelo de la patogenia de la EC, existe un modelo teórico, aún incompleto, basado en evidencia experimental que ayuda a entender el posible inicio y desarrollo de la enfermedad celíaca. Es en este modelo, donde hay interés por incorporar nuevos conocimientos que ayuden a extender la comprensión de la patología, para mejorar la prevención, validar nuevos modelos animales, como también diseñar nuevos tratamientos. Es aquí donde las alarminas mencionadas pueden verse involucradas en varios nodos del modelo. Se ha visto que las alarminas pueden jugar un rol en eventos de maduración de células dendríticas y moderadoras del perfil T efector, en la activación y proliferación de células T efectoras, en la inducción de respuestas proinflamatorias del epitelio y endotelio, y en la activación de la inmunidad innata. Es por ello, por lo que se puede postular un rol relevante para estas proteínas en la EC.

Como ya se ha comentado, la patogenia de la EC se basa en la generación de células T, de perfil Th1, reactivas a péptidos derivados de gliadinas en el intestino delgado de individuos con susceptibilidad genética. Dicha respuesta inmune conduce a la producción local de IFNs tipo I y II, junto con IL-21, y TNF α (Abadie *et al.*, 2011). La hipótesis general de nuestro trabajo es que dichas moléculas son capaces de generar un ambiente inflamatorio con una inducción de las vías de muerte celular proinflamatoria (piroptosis y necroptosis) tanto en células de la inmunidad innata, como estromales (endoteliales, epiteliales, fibroblastos), al mismo tiempo que se desencadenan vías pro-apoptóticas en otras células (Shalimar *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2021). Curiosamente, estos eventos se caracterizan por generar respuestas antagónicas, la apoptosis genera respuestas tolerogénicas, mientras que los eventos derivados de muerte por necroptosis y piroptosis inducen respuestas proinflamatorias. Dicha respuesta inflamatoria local es llevada a cabo por dos grandes grupos de proteínas: alarminas (IL-33, HMGB1, IL-1 α , entre otras) y citoquinas (IL-1 β , IL-18 e IFNs I y II) Estos mediadores, amplifican la respuesta inflamatoria inicial, estimulando la respuesta del sistema inmune Tipo 1 y/o la respuesta citotóxica. La respuesta citotóxica induce apoptosis de las células estresadas por el ambiente inflamatorio. El conjunto de respuestas inducidas conduce al daño histológico del intestino delgado de los pacientes celíacos activos.

Nuestro grupo de trabajo se ha abocado al estudio de eventos de muerte proinflamatoria en la mucosa de los pacientes celíacos y cómo dichos eventos influyen los nodos del modelo patogénico mencionado en el anexo. En este sentido, nos enfocaremos en el estudio de las alarminas IL-33, IL-1 α y HMGB1, su expresión y su potencial rol biológico en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos.

El estudio de estas alarminas en EC es muy incipiente, de hecho, solo se han publicado dos artículos, uno relación entre IL-33 (López-Casado *et al.*, 2017) y otro sobre HMGB1 (Manti, Cuppari, Tardino, *et al.*, 2017) que serán discutidos en las siguientes secciones.

4.3 Objetivos específicos de la parte A

- Describir y analizar el eje IL-33/ST2 en la mucosa intestinal humana y en pacientes celíacos activos. Analizar las células involucradas en este eje y evaluar posibles roles en la patogenia de la enfermedad celíaca.
- Describir y analizar los ejes IL-1 α /IL-1R y HMGB1 en el intestino delgado de pacientes celíacos al diagnóstico y muestras de población control.

4.4 Hipótesis de trabajo de la parte A

Las hipótesis de este trabajo se desarrollan en los siguientes puntos:

- Hipótesis 1: Existe una asociación entre la enfermedad celíaca activa y el nivel de expresión de las alarminas IL-33, HMGB1, IL-1 α . Existe una inducción de estas proteínas en la enteropatía celíaca.
- Hipótesis 2: Existe una mayor liberación de las alarminas IL-33, IL-1 α y HMGB1 en la mucosa duodenal con enteropatía celíaca.

4.5 Resultados de la evaluación del eje IL-33/ST2

4.5.1 Evaluación de los niveles de IL-33 y ST2s en suero de pacientes celíacos activos y no celíacos

Para comenzar el estudio de este eje, determinamos los niveles circulantes de IL-33 y de ST2s en suero de pacientes ACD y NC, empleando ELISA comerciales. Como se muestra en la **Figura 9**, los pacientes celíacos activos presentan mayores niveles circulantes de IL-33 y de la versión soluble de ST2, ST2s. Estos hallazgos son similares a los descritos por Lopez-Casado y col. (López-Casado *et al.*, 2017), estudiando una población pediátrica española. Si bien, estos resultados sugieren que estas proteínas han sido liberadas al medio extracelular, no indican que sean expresadas a nivel intestinal, ni como consecuencia de una respuesta local en intestino delgado. Para realizar esta evaluación se analizó la expresión de IL-33, ST2L y ST2s en biopsias intestinales de pacientes ACD y NC.

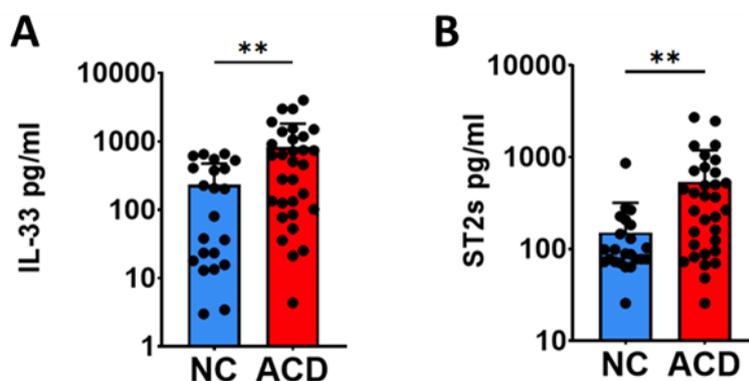


Figura 9- Niveles de IL-33 y ST2s en suero de pacientes celíacos activos (ACD) y controles no celíacos (NC). A.- Niveles circulantes de IL-33 en ACD (n=33) y NC (n=20). B.- Niveles séricos de ST2s en ACD (n=36) y NC (n=39). En los gráficos, se muestran los niveles de cada paciente con un punto negro, las barras representan en valor promedio de cada población y su error estándar (SEM). Se utilizó un análisis por “test de student” no pareado, con una corrección de Welch para poblaciones con desviación estándar diferente (** p<0.01).

4.5.2 Evaluación del nivel de expresión de IL-33, ST2L y ST2s en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos

Para realizar una evaluación cuantitativa de la expresión de estas proteínas realizamos estudios por western-blot de proteínas totales extraídas de piezas de biopsias duodenales tanto en pacientes celíacos como de muestras de población control. Como se muestra en la **Figura 10-A**, ST2s presentó un peso molecular de aproximadamente 57 kDa, mientras que la versión receptor de membrana presentó pesos moleculares en el rango de 72 a 100 kDa. Esta variedad de bandas proteicas para el ST2L pueden ser consecuencia de diferentes modificaciones postraduccionales por N-glicosilación (Yoshida *et al.*, 1995). En la **Figura 10-B**, se observa que los niveles de ambas proteínas se encuentran significativamente aumentados en muestras de la población celíaca activa. Estos aumentos, por si solos, no permiten definir si la IL-33 libre es capaz de mediar una señal transmembrana. Esto se debe a la capacidad de IL-33 para unirse a su receptor depende

no solo del aumento de IL-33 libre, sino también de las concentraciones relativas de las versiones ST2L y de ST2s. Por esta razón, en la **Figura 10-C** se muestra la evaluación de la relación ST2L/ST2s, donde se observa que no hay diferencias entre la población NC y la ACD. Esto último confirma que el aumento de la producción local en la mucosa duodenal en EC de ambas versiones es balanceada y equivalente a la mucosa normal. Por lo tanto, se estima que IL-33 pueda señalar en la mucosa duodenal en EC activa.

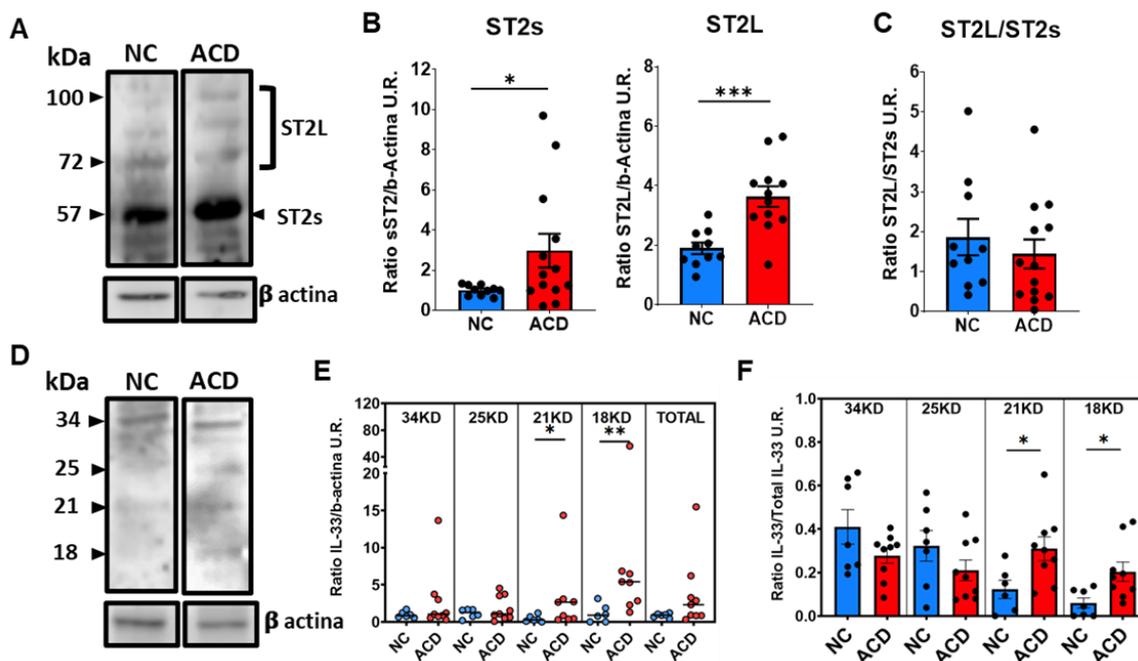


Figura 10- Análisis de expresión de IL-33 y ST2 mediante western-blot de proteínas totales extraídas de la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos y no celíacos. A y D.- Imágenes representativas de los western blot realizados para ST2L y ST2s o de las diferentes versiones producto de corte enzimático de IL-33 (25 kDa, 21/20 kDa o 18 kDa) y la versión completa (34 kDa). Se utilizó beta-actina como control interno de la corrida. **B.-** Resultados de la comparación de la relación de la densidad de intensidad de cada una de las bandas correspondientes a ST2s o ST2L normalizadas con la señal de la beta actina normalizados a los controles sanos, para pacientes ACD (ST2L n= 12, ST2s n= 13) y NC (ST2L n= 10 y ST2s n= 10). **C.-** Relación entre la señal de ST2L y ST2s para ACD (n= 12) y NC (n=10). **E.-** Relación de densidad de intensidad de cada una de las bandas de IL-33 y la beta actina normalizadas con los controles para pacientes ACD (n=9) y NC (n=7). **F.-** Relación de la densidad de intensidad de cada una de las bandas de IL-33 contra la suma total de todas ellas para cada paciente ACD (n=9) y NC (n=7). Los gráficos se muestran con la media de cada población y el error estándar (SEM). Se empleó test de Student no paramétrico para todas las comparaciones (* p<0.05; ** p<0.01, *** p<0.001) a excepción de E, donde se utilizó un análisis no paramétrico de Mann-Whitney.

El estudio de IL-33 (**Figura 10-D**) muestra diferentes versiones o “fragmentos” con pesos moleculares que se corresponden a los productos de corte con enzimas extracelulares como: elastasa de neutrófilos, catepsina G, quimasa, triptasa y granzima B. Según bibliografía, estas enzimas generan productos C-terminales de 21/20 kDa y 18 kDa, los cuales presentan mayor actividad biológica (Lefrançois *et al.*, 2012; Lefrançois *et al.*, 2014).

En el caso de los fragmentos de 25 kDa resulta difícil identificarlos como subproductos de la actividad proteolítica de las enzimas mencionadas, o de las caspasas 3/7 en apoptosis (Lüthi *et al.*, 2009). Como se ve en la **Figura 10-E**, encontramos diferencias significativas en la producción de los fragmentos de 21/20 kDa y el de 18 kDa, no así en la proteína completa (aproximadamente de 34 kDa) o en las versiones de 25 kDa. Mientras que en la **Figura 10-F** se observa que la cantidad relativa a la proteína total de los fragmentos 21/20 kDa y 18 kDa está incrementada en los pacientes ACD. Estos hallazgos sugieren la presencia de diferentes mecanismos enzimáticos capaces de incrementar la bioactividad de la IL-33.

En conjunto, estas observaciones indican que la mucosa duodenal de los pacientes ACD presentan una liberación activa de IL-33. A su vez, y basándonos en datos bibliográficos, consideramos que la proteína IL-33 podría tener mayor bioactividad debido a la abundancia de las versiones de 18 kDa y 20/21 kDa. En cuanto a ST2s, como así también de la versión de membrana ST2L, en los pacientes celíacos observamos una mayor expresión de ambas versiones, sin alterarse la relación entre ellas.

4.5.3 Evaluación histológica de la expresión y localización de la IL-33 y su receptor ST2 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos

En la **Figura 11** se observa que la IL-33 se expresa en epitelio y *lamina propria* de ambos grupos de pacientes. Es llamativo que se observe una localización tanto puntual de la marca de IL-33 como en forma difusa. Dichas diferencias corresponden a la presencia de IL-33 nuclear (intensa y bien localizada) y citoplasmática/extracelular (difusa). En mucosa duodenal de pacientes celíacos, la expresión de IL-33 parece abarcar una mayor área, y existe una notable presencia de marca citoplasmática difusa. Con la finalidad de comparar el nivel de expresión, se realizó una serie de medidas de la densidad de la intensidad de la marca o como llamaremos de ahora en adelante “RFD” (ver Materiales y Métodos). Dicho análisis confirmó un aumento en la señal de IL-33 en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos tanto en el epitelio como en la *lamina propria* (**Figura 11-B**).

Para el receptor de IL-33, ST2, se observa localización en ambos compartimentos tanto para pacientes ACD y NC (**Figura 11-C**). A diferencia de IL-33, ST2 presentó una marca discreta, no difusa. El análisis de RFD (**Figura 11-D**), arrojó resultados similares a los encontrados para su ligando, con un aumento de señal en los pacientes ACD tanto en el epitelio como en la *lamina propria* subyacente.

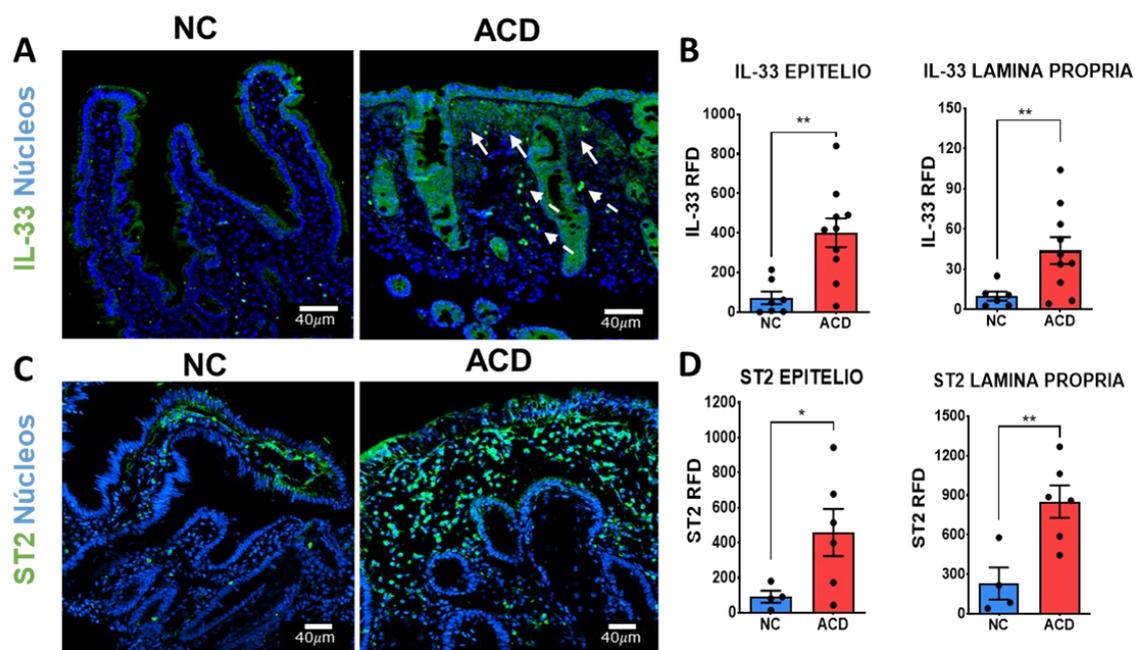


Figura 11- Niveles de expresión y localización histológica de IL-33 y ST2 en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos y controles no celíacos. A y C.- Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia indirecta para IL-33 y ST2 (ambos en color verde y los núcleos en color azul) en cortes de biopsias de la segunda porción de duodeno de pacientes celíacos activos (ACD) y controles no celíacos (NC). Las flechas blancas indican las zonas de expresión de IL-33 asociadas al infiltrado de la *lamina propria* próximas al epitelio luminal. B y D.- Análisis de la densidad relativa de fluorescencia (RFD) para IL-33 y ST2 en los compartimientos epiteliales o *lamina propria*. Los resultados se muestran como los resultados de cada paciente como un punto y el promedio con las barras indicando el error estándar (SEM). El análisis estadístico fue “test de student” no pareado (* p<0.05; ** p<0.01).

4.5.4 Evaluación de células IL-33⁺ en la mucosa duodenal de ACD y NC

En la **Figura 12** se observa que una diversidad de tipos celulares expresa IL-33 en los pacientes ACD. Inicialmente, se estudiaron las células descritas en la bibliografía como posibles productoras de la IL-33 (Pichery *et al.*, 2012). Particularmente, se observaron células IL-33⁺ con disposiciones muy ordenadas, de tipo ahusadas, en la *lamina propria*, lo que sugería potenciales células endoteliales y fibroblastos como productores de esta alarmina. Estas células resultaron ser positivas para el marcador de células endoteliales CD31, y presentaron una expresión tanto nuclear como citoplasmática (**Figura 12-A y B**). En menor medida, se encontraron células IL-33⁺ SMA⁺, que correspondían a miofibroblastos. Dada la localización perivascular de muchas de las células SMA⁺ es posible que alguna de ellas sean pericitos. Asimismo, algunas de las células SMA⁺ que presentaban una localización pericriptica fueron identificadas como fibroblastos CD90⁺ (**Figura 12-C**). De esta forma, la mayoría de las células IL-33⁺ con localización nuclear corresponden a células endoteliales, y en menor medida fibroblastos y pericitos.

Las demás células que expresan IL-33 en la *lamina propria* presentaron una localización citoplasmática, en particular, esto fue notorio en algunas células CD45⁺ (**Figura 12-E**). Parte de estas células, presentaban marcadores compatibles con células presentadoras de

antígeno, células dendríticas, como CD11c⁺ (Figura 12-F), o CD64⁺ sugiriendo que son macrófagos o neutrófilos (Figura 12-H). Por otro lado, se encontraron células B (CD20⁺) productoras de IL-33 (Figura 12-G). En el compartimiento epitelial, se encontraron enterocitos (EpCAM⁺ y CD45⁻) IL-33⁺. Estas células presentaron una marca difusa en el núcleo y citosol (Figura 12-D y I).

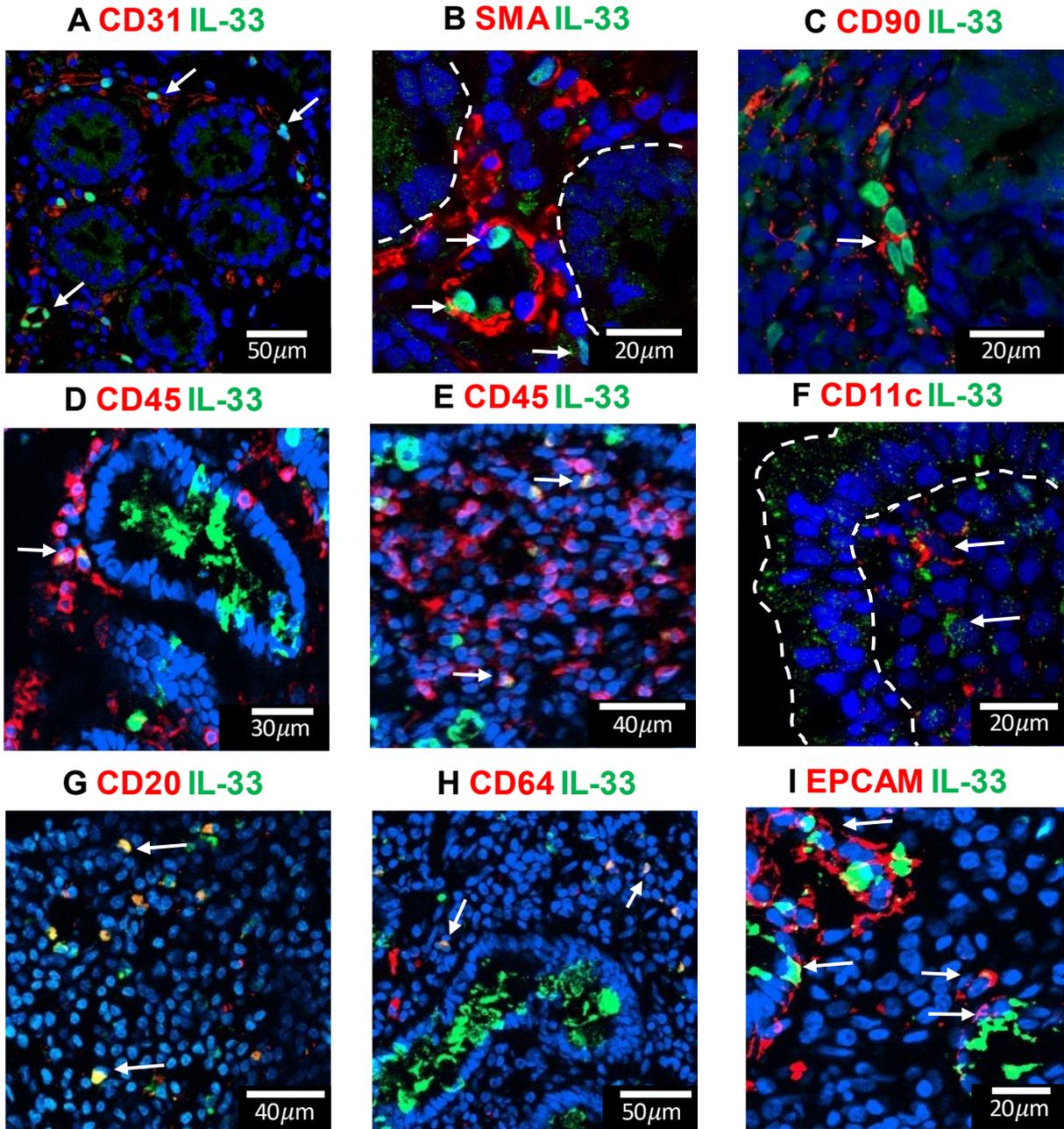


Figura 12- Células IL-33⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes ACD. Se muestran imágenes representativas de las células IL-33⁺ en *lamina propria* y epitelio. En algunas imágenes se muestra el límite entre el epitelio y la *lamina propria* se muestra con una línea blanca punteada. Algunas de las células doble-positivas tanto para IL-33 como para los marcadores, están indicadas con flechas blancas. En todas las imágenes, IL-33 aparece en color verde, los núcleos en azul y los marcadores de linaje en rojo. Se muestran barras blancas con las escalas de cada imagen. **A.-** CD31 marcador de células endoteliales. **B.-** SMA (actina de músculo liso) como marcador de miofibroblastos y pericitos, algunos cercanos a las criptas epiteliales. **C.-** CD90 como marcador de fibroblastos. **D.-** CD45, identifica leucocitos y células mieloides. En la imagen D se ven enterocitos IL-33⁺CD45⁻. **E.-** Se ven algunas células CD45⁺IL-33⁺ dispersas en la *lamina propria*, indicadas con flechas blancas. **F.-** CD11c se utilizó como marcador de células dendríticas, las cuales aparecen en zonas cercanas al epitelio. **G.-** Se utilizó CD20 para marcar a las células B. **H.-** El CD64 se utilizó para marcar a las células macrófagos, y potencialmente algunos neutrófilos. **I.-** Se marcaron los enterocitos con EpCAM (CD326).

4.5.5 Evaluación de células ST2⁺ en la mucosa duodenal de ACD y NC

De forma análoga a lo realizado en el punto anterior para la IL-33, nos interesó estudiar cuáles eran sus potenciales células blanco. Para ello, se utilizó una serie de marcadores de linaje de células capaces de expresar ST2 según bibliografía. Este estudio se realizó por inmunofluorescencia indirecta en cortes de biopsias duodenales, aunque se hace notar que no es posible evaluar en forma separada las versiones ST2L y ST2s. Esto es debido a que lo anticuerpos comerciales reconocen regiones compartidas entre ambas versiones. Por otro lado, es poco probable que existan células (ST2s⁺ ST2L⁻ o ST2L⁺ST2s⁻) que produzcan estas variantes por separado. Es por esto, que este análisis identifica células que expresan cualquiera de las dos versiones.

La **Figura 13** muestra diferentes tipos celulares que expresan ST2. Entre ellas, la mayoría resultaron linfocitos dispersos en el epitelio, y en la *lamina propria*. Se observa un incremento de células de origen hematopoyético (CD45⁺) ST2⁺ en el total de la mucosa y en la *lamina propria*, y una tendencia no significativa en el epitelio (**Figura 13-B**). Esta observación se confirma por el análisis de RFD realizado en las células CD45⁺ en la biopsia completa (**Figura 13-G**). Para el caso de los linfocitos T, se encontró un aumento de las células CD3⁺ST2⁺ en el epitelio de los pacientes celíacos activos, sin llegar a ser significativo en *lamina propria* (**Figura 13-C**). Esto puede deberse a la presencia de poblaciones diferentes de linfocitos T en cada uno de los compartimientos. Para evaluar esta diferencia dentro de las células CD3⁺, se empleó la marcación con CD8. En la **Figura 13-D**, se puede ver el aumento significativo de células CD8⁺ST2⁺ en la biopsia total y en el epitelio, mientras que en la *lamina propria* solo se observó una tendencia no significativa. El análisis de RFD confirmó las observaciones anteriores y, además, expuso un aumento de la señal ST2 en las células CD8⁺ de la *lamina propria* (**Figura 13-D**). Estos resultados muestran un incremento en el número de células T CD8⁺ST2⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes ACD, y sugieren que IL-33 podría estar actuando como una alarmina pro-citotóxica. Esta observación se corresponde con estudios que muestran que la mayoría de las células T CD8⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes ACD, presentan un fenotipo citotóxico (Meresse *et al.*, 2004, 2006). Al mismo tiempo, es conocido el rol de la IL-33 como potenciador de estos procesos en infecciones virales y respuestas inmune de tipo 1 (Yang *et al.*, 2011; Bonilla, Frohlich, *et al.*, 2012).

Por otro lado, en la *lamina propria* encontramos células plasmáticas ST2⁺CD138⁺ y células, posiblemente macrófagos, CD64⁺ST2⁺. En ambos casos, no se encontraron diferencias en la proporción de estas células entre ambos grupos de pacientes. Sin embargo, su hallazgo es interesante ya que sugiere la presencia de macrófagos sensibles

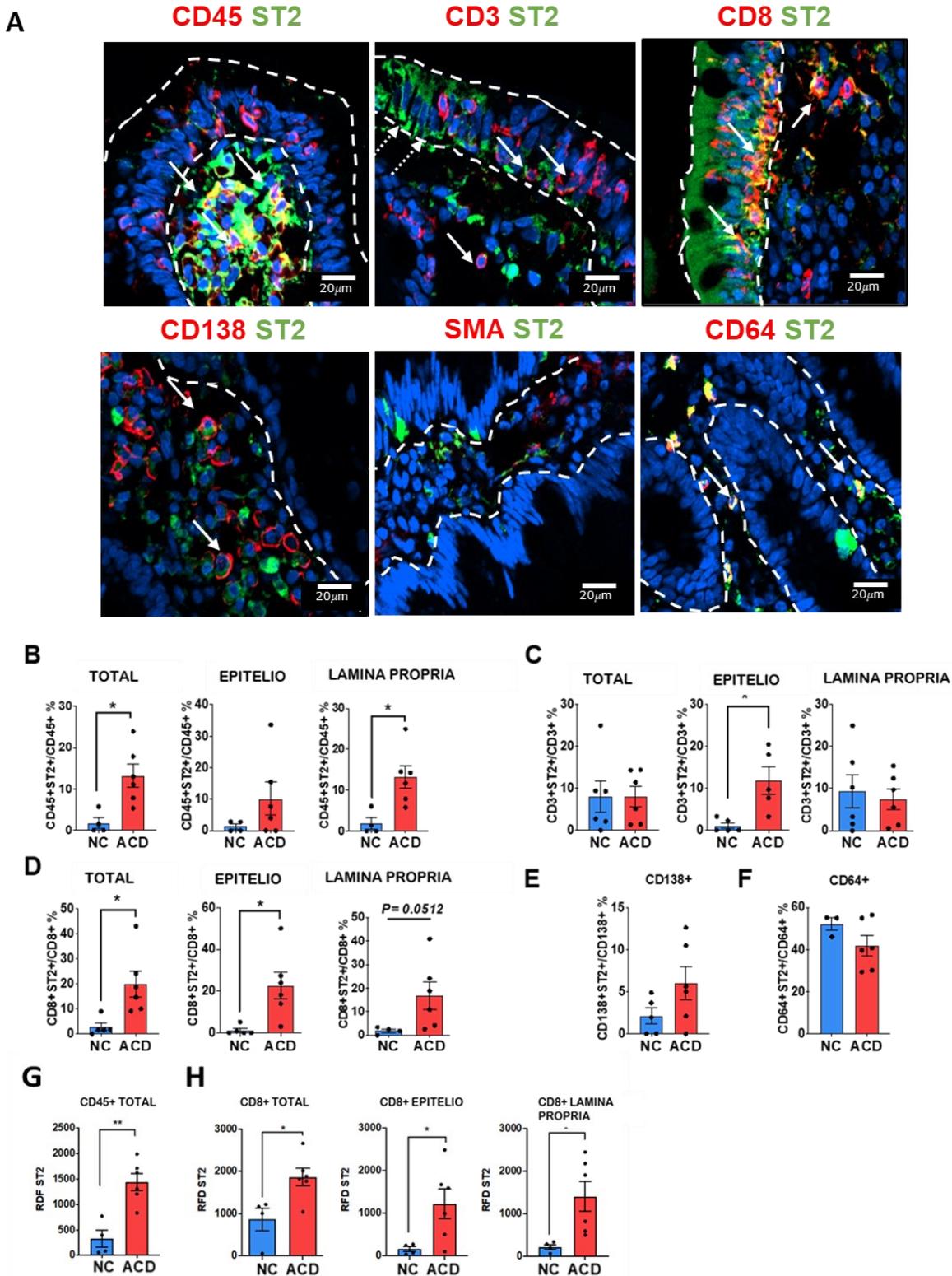


Figura 13- Células ST2⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos. Se muestran imágenes representativas de las células ST2⁺ en *lamina propria* y epitelio de mucosa duodenal de pacientes celíacos (ACD) y población control (NC). El límite entre el epitelio y la *lamina propria* se muestra con una línea blanca punteada. Algunas de las células doble-positivas tanto para ST2 como para los marcadores en estudio, están indicadas con flechas blancas. En algunos casos, las células epiteliales ST2⁺ fueron marcadas con flechas blancas cortadas. En todas las imágenes, ST2 aparece en color verde, los núcleos en azul y los marcadores de linaje en rojo. **A.-** Se utilizó el marcador CD45 para identificar a las células de origen hematopoyético tanto en epitelio como *lamina propria*. El marcador CD3 para identificar a las células T, y el marcador CD8 para identificar a las células T CD8⁺, en los mismos compartimientos. Por otro lado, el marcador CD138 identificó a las células plasmáticas. El marcador SMA para evidenciar células miofibroblastos, y el marcador CD64 para identificar macrófagos y posiblemente neutrófilos. **B.-** Resultados de los recuentos para las células CD45⁺ en el total de la mucosa, en el epitelio o en la *lamina propria*. El mismo análisis se realizó para CD3 (**C**) y CD8 (**D**). **E.-** Recuentos de las marcas CD138 y en F para el marcador CD64. **G.-** Análisis por RFD de CD45⁺ en el tejido entero y en **H** para CD8 en cada uno de los compartimientos. En todos los casos los gráficos se presentan para cada una de las poblaciones de estudio ACD y NC, con la media de la distribución en la posición superior de la barra de color y las barras oscuras indicando el error estándar (SEM). Los ensayos estadísticos fueron “Test de Student” no pareados con corrección de Welch para comparaciones entre poblaciones con diferentes dispersiones si fuera necesario (* p<0.05; ** p<0.01).

a IL-33, los cuales podrían participar en mecanismos de reparación del daño tisular (Yin *et al.*, 2013). Además, el hallazgo de células plasmáticas CD138⁺ST2⁺ es una observación no descrita, ya que las únicas células B respondedoras a IL-33 en la mucosa son las B1 (Komai-Koma *et al.*, 2011). Finalmente, la marcación con anticuerpos anti-SMA no permitió encontrar suficientes células ST2⁺SMA⁺.

4.5.6 Las células ST2⁺ expresan T-bet

Nos interesó corroborar si las células ST2⁺ expresaban factores nucleares asociados a respuestas proinflamatorias de tipo 1, en especial T-bet, por su rol en la diferenciación de linfocitos Th1 (Kallies and Good-Jacobson, 2017). En la **Figura 14**, se muestra el análisis por inmunofluorescencia, donde se observa que un gran número de células ST2⁺ expresan el marcador T-bet. Estas células se encontraron principalmente en la *lamina propria* y en menor medida en el epitelio de la mucosa duodenal de los pacientes ACD. Futuros análisis permitirán comparar el número de células ST2⁺T-Bet⁺ entre las poblaciones de estudio.

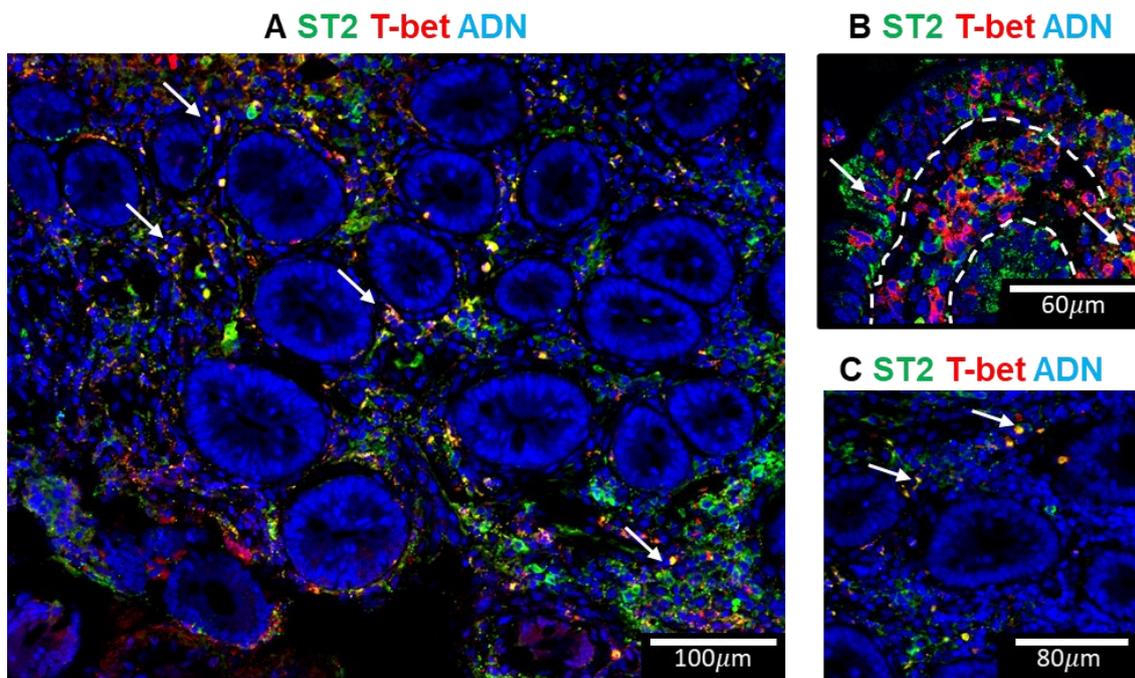


Figura 14- Células ST2⁺T-bet⁺. Micrografías con diferentes magnificaciones finales, correspondientes a la marcación de ST2 (verde), T-bet (rojo) y núcleos (azul). El límite entre el epitelio y la *lamina propria* se muestra con una línea blanca punteada. Algunas de las células doble-positivas están indicadas con flechas blancas. **A. y B.-** Células doble positivas ST2⁺T-bet⁺ (amarillas) en *lamina propria* de la mucosa intestinal de un paciente celíaco sin tratamiento. **C.-** Células ST2⁺T-bet⁺ en el epitelio apical de la mucosa intestinal de un paciente celíaco sin tratamiento.

4.5.7 Modulación de la IL-33 epitelial por estímulos inflamatorios

Para evaluar una posible modulación de la expresión de IL-33 en células epiteliales se utilizó a las células HT-29 (modelo de células epiteliales intestinales humanas). Estas células fueron estimuladas por diferentes tiempos (6, 24 y 48 hs) con citoquinas proinflamatorias (IFN γ , IFN β) que se encuentran incrementadas en la mucosa duodenal de pacientes celíacos (Nilsen *et al.*, 1998; Monteleone *et al.*, 2001). También se incluyó como estímulo el péptido derivado de gliadinas p31-43, que nuestro grupo ha demostrado induce respuestas proinflamatorias en la mucosa de intestino proximal en ratón cuando es administrado por vía intragástrica (Gómez Castro *et al.*, 2019). Además, incluimos al estímulo con poly I:C (PIC) como agonista de TLR3, capaz de inducir IL-33 en otras células epiteliales (Zhang *et al.*, 2011). Hemos evaluado distintas condiciones de estimulación basados en datos previos de bibliografía usando estos estímulos. En la **Figura 15**, se observa que el PIC fue el único de los estímulos evaluados capaz de estimular la producción de IL-33 en las HT-29 en estas condiciones. Este constituye en modelo simple para que, en futuros evaluaciones, se estudien las señales que conducen a la expresión de IL-33 en células epiteliales.

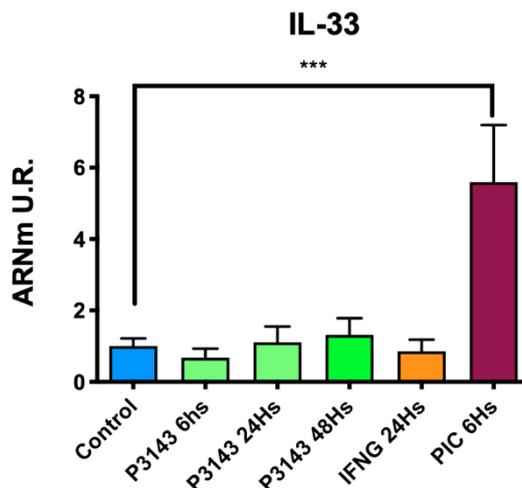


Figura 15- Niveles relativos (U.R.) de ARNm del gen IL-33 en células HT-29 estimuladas. Las células HT-29 fueron estimuladas en base a diferentes esquemas según el estímulo en particular. Se estimularon con p31-43 (100 μ g/mL) en tres tiempos diferentes (6, 24 y 48 hs), IFN γ (50 ng/mL) por 24 hs y PIC (10 μ g/mL) por 6hs. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA post-test Dunnet, (***) significa p-Valor < 0.001). Los ensayos mostrados corresponden a 3 repeticiones independientes con triplicados en cada repetición. Se muestran gráficos de barra para cada estímulo evaluado con sus correspondientes valores de error sistemático.

4.5.8 Modulación de la expresión de IL-33 en un modelo murino de inflamación aguda

Con el fin de evaluar la modulación de IL-33 *in vivo* en intestino delgado empleamos un modelo experimental de enteropatía en ratones C57BL/6 desarrollado por nuestro grupo (Araya *et al.*, 2014; Gómez Castro *et al.*, 2019). En este modelo, se administró por vía intragástrica los estímulos: p31-43 (20 μ g/ ratón), PIC (30 μ g/g animal) y p31-43 (20 μ g/ ratón) + PIC (30 μ g/g animal) o el vehículo PBS. A las 16 hs post-estímulo se procesaron los tejidos para evaluar la expresión de IL-33 por inmunofluorescencia y western-blot.

En la **Figura 16**, se observa que todos los estímulos generaron un daño histológico leve caracterizado por un incremento del número de linfocitos intraepiteliales (LIEs) y una disminución de la relación V/C. Los estímulos PIC y PIC+p31-43 incrementaron la expresión de IL-33 en células epiteliales (**Figura 17**). El análisis de RFD muestra que el aumento de intensidad de la marca fue solo evidente con el estímulo combinado de PIC + p31-43, lo que concuerda con la medida de IL-33 total por western-blot. Por lo tanto, los resultados sugieren que p31-43 o PIC no generan, por sí mismos, un aumento significativo en la expresión de IL-33, pero que ambos estímulos combinados desencadenan señales complementarias que potencian la inducción de IL-33.

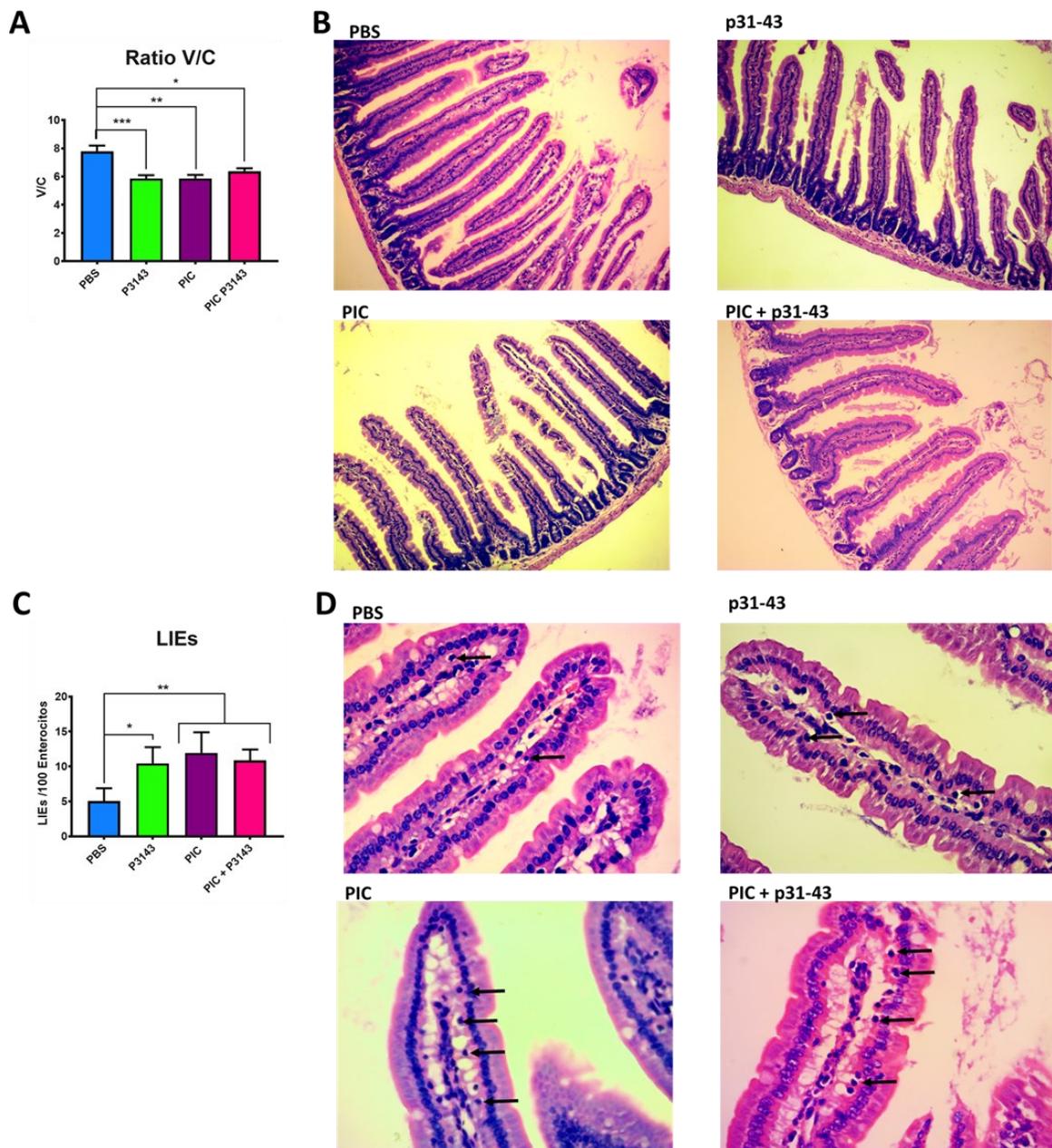


Figura 16- Modelo murino de inflamación aguda en duodeno. **A.-** Relación V/C en los animales estimulados con p31-43 (n=4), PIC (n=5), PIC+p31-43 (n=5) o el control de vehículo PBS (n=4). **B.-** Imágenes representativas de la tinción H&E de intestino delgado proximal según el tratamiento. Las imágenes se muestran con un aumento de 200X final. **C.-** Recuentos manuales de LIEs por cada 100 enterocitos para cada una de las condiciones ensayadas: p31-43 (n=4), PIC (n=5), PIC+p31-43 (n=5) o el control de vehículo PBS (n=4). **D.-** Imágenes representativas de los compartimientos epiteliales utilizados para los recuentos de LIEs. Las imágenes se encuentran con un zoom de 400X final, y las flechas negras indican algunos de los LIEs. En todos los casos los gráficos representan la media y las barras oscuras son correspondientes al error estándar (SEM). Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA post- prueba de Dunnet (* p<0.05, ** p<0.01, y *** p<0.001).

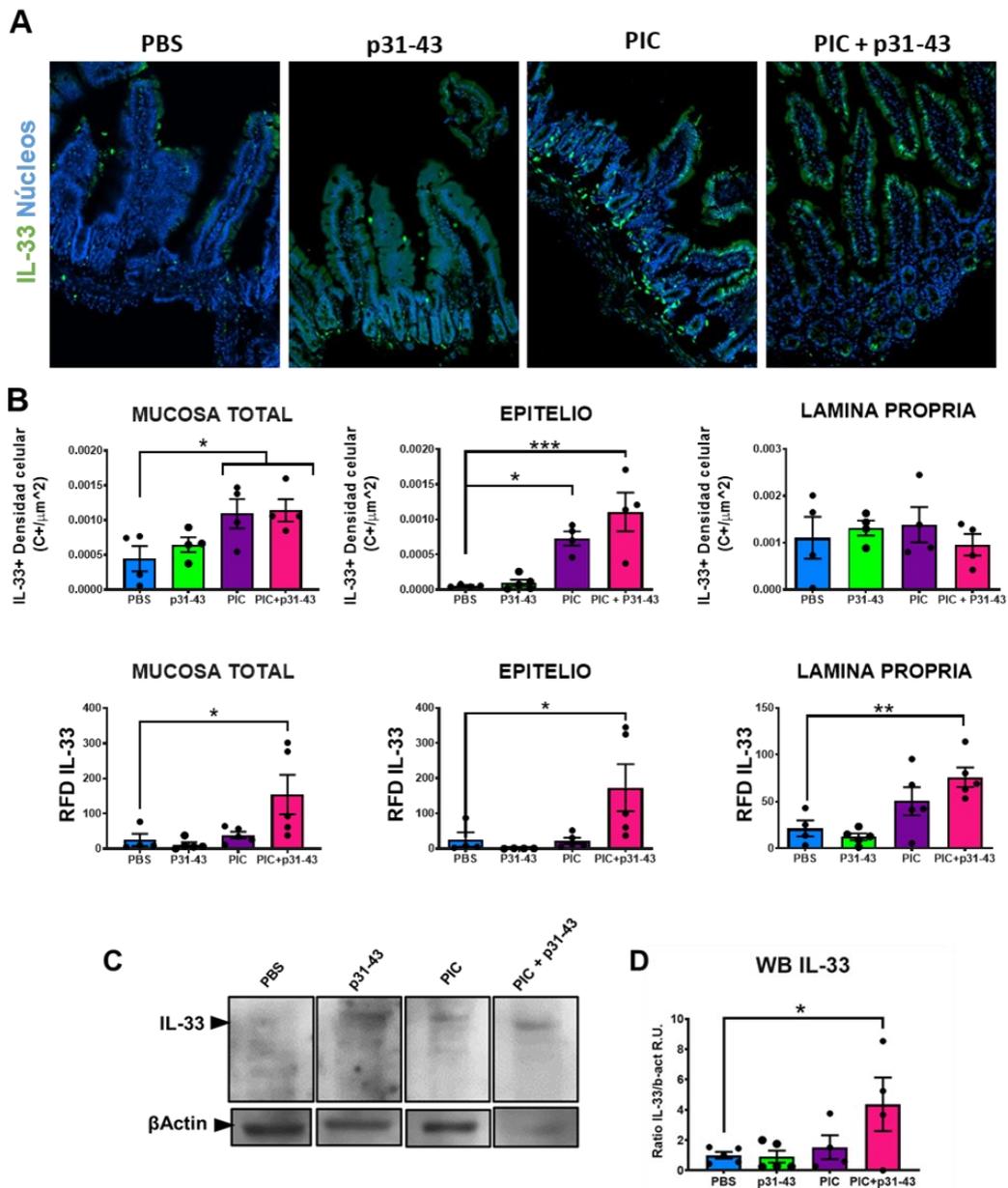


Figura 17- Modulación de la producción de IL-33 en un modelo de inflamación intestinal aguda. **A.-** Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de IL-33 en intestino delgado proximal de animales tratados con: PBS, p31-43, PIC o PIC+p31-43. En las imágenes, IL-33 aparece en verde y los núcleos en azul. Las imágenes fueron obtenidas con un zoom de 200X final. **B.-** Recuentos manuales de las células IL-33⁺ expresados como densidad de células IL-33⁺ por área (μm^2). También se muestran los resultados de los análisis de RFD de las mismas imágenes. Los resultados se presentan en la mucosa total, epitelio o la *lamina propria*. En todos estos casos se utilizó: n=4 para control (PBS), n=4 p31-43, n=5 PIC y n= 5 PIC+ p31-43. **C.-** Imágenes representativas del análisis por western-blot de proteína total de intestino delgado proximal de los animales tratados para todos los estímulos. Se encuentra señalada a la banda correspondiente a la IL-33 completa (aproximadamente 31 kDa), y a la beta-actina utilizada como control interno. **D.-** Análisis de la relación de intensidad de banda de IL-33 relativos al control de beta-actina. Se utilizó un n= 5 PBS, n=5 p31-43, n=4 PIC y n=4 PIC+p31-43. En todos los casos los gráficos representan la media y las barras oscuras son correspondientes al error estándar (SEM). Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA post- prueba de Dunnet (* p<0.05, ** p<0.01, y *** p<0.001).

4.5.9 Análisis de la expresión transcripcional de los factores del eje IL-33/ST2 en intestino delgado humano

Debido a que IL-33 fue eficazmente inducida *in-vitro* e *in-vivo* mediante el agonista TLR3 poly I:C, y que parte de las células ST2⁺ resultaron ser linfocitos T CD8⁺, nos interesó evaluar si otros factores asociados a la EC y a infecciones virales correlacionaban con los componentes del eje. El principal motivo para realizar este estudio se fundamenta en que varios modelos de infecciones virales *in vitro*, y modelos murinos, conllevan a una activación del sistema IL-33/ST2. A su vez, este eje es capaz de inducir una respuesta inflamatoria parcialmente dependiente de células T CD8⁺ ST2⁺ citotóxicas. Entre estos factores, la vía de Interferones es una de las más vinculadas con ambos fenómenos (Yang *et al.*, 2011; Arshad *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2017; Stav-Noraas *et al.*, 2017; Baumann *et al.*, 2019; Aparicio-Domingo *et al.*, 2020). Es por ello, que decidimos estudiar mediante RT-qPCR, el nivel de expresión de ARNm de los correspondientes transcritos de los genes *IL33*, *IL1RL1* (ST2s y ST2L) en las poblaciones de control y celíacos activos, y su potencial correlación con el nivel de expresión de transcritos asociados a la respuesta a IFNs. Entre estos últimos se seleccionaron a los transcritos correspondiente a los genes *IFNB1*, *IFNG*, *IL10*, *IRF1*. A su vez, se realizaron las correlaciones entre los niveles relativos entre dichos factores y también se incluyó las relaciones IFNG/IL10 e IFNB1/IL10.

La **Figura 18** muestra una tendencia, no significativa, a una mayor expresión para los niveles de transcritos de IL33, ST2s y ST2L en los pacientes ACD. Por otro lado, se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre ciertos componentes del eje, como IL-33 y ST2s y mediadores inflamatorios. En particular, se destacan cuatro correlaciones significativas (**Figura 18-(C-E)**). De esta forma, encontramos correlaciones entre IL-33 y ST2s. No se encontraron correlaciones significativas entre IL-33, ST2-S/L con IFNG, IFNB1 o IL10. Sin embargo, si se observó una correlación entre IL33, ST2s e IRF1. Esto resulta particularmente interesante, porque IRF1 es uno de los principales factores de transcripción regulados por IFNs, y al mismo tiempo, es un factor asociado con la expresión de IL-33 en células endoteliales sometidas a infecciones virales (Stav-Noraas *et al.*, 2017). A su vez, estos resultados sugieren que los IFNs podrían estar vinculados con el nivel de expresión de factores del eje IL-33/ST2.

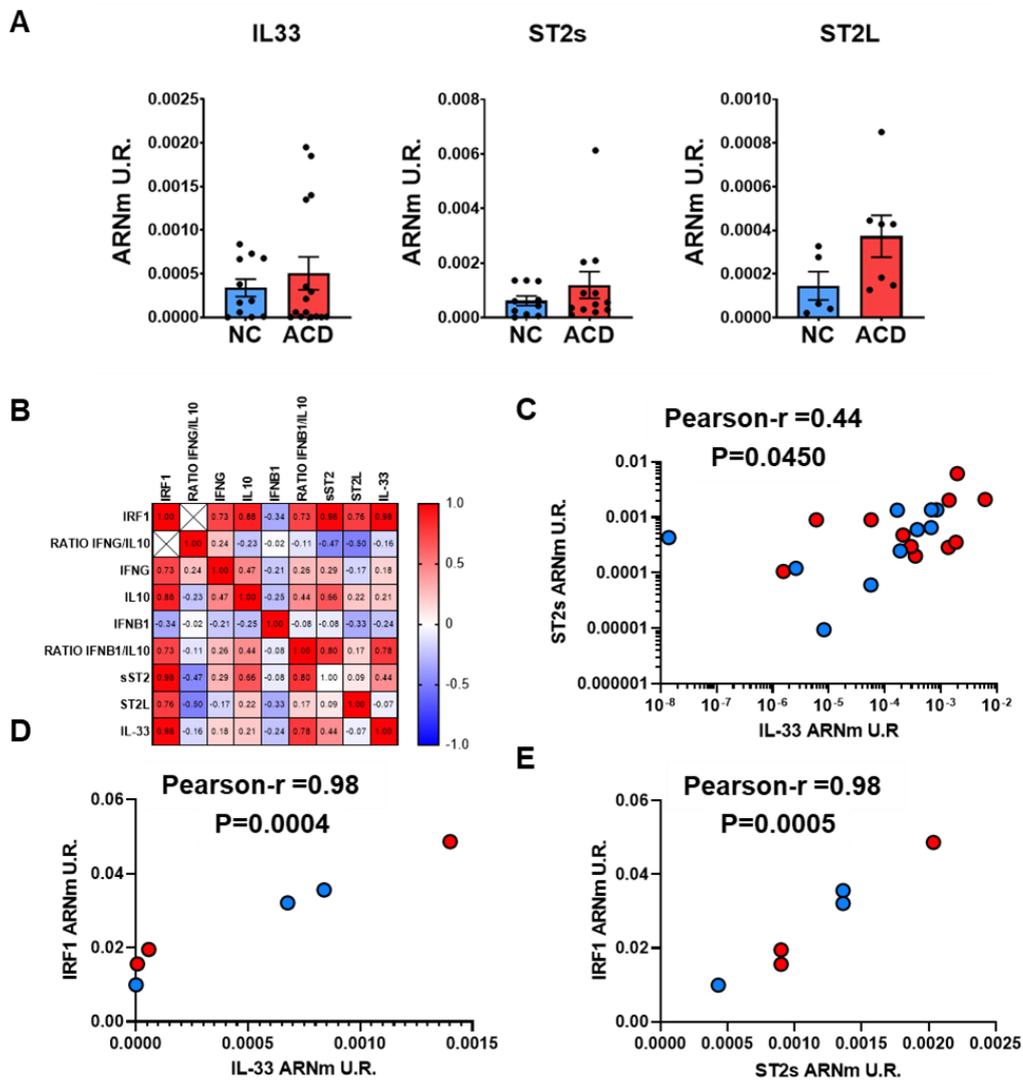


Figura 18- Correlación entre factores del eje IL-33/ST2 y mediadores inflamatorios en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. **A.-** Gráficos de barra con SEM que muestran los niveles relativa de expresión de IL33 (NC, n = 11; ACD, n= 15), ST2s (NC, n= 10; ACD, n = 12) y ST2L (NC, n= 5; ACD, n = 7). El análisis estadístico empleado fue Test de Student no pareado con corrección de Welch. **B.-** Mapa de calor para las correlaciones (r de Pearson) entre los factores analizados. En los demás gráficos se muestran los análisis de correlación entre los niveles de expresión relativos para ST2s e IL-33 (**C**), IRF1 con IL-33 (**D**), e IRF1 con ST2s (**E**). En todos los casos de análisis de correlación se realizaron por el test de Pearson. En los gráficos C-E, se muestran el p-valor y el índice r de Pearson correspondiente.

4.6 Resultados de la alarmina IL-1 α

4.6.1 Expresión de la alarmina IL-1 α en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos

En el análisis por microscopía de fluorescencia se observa que la IL-1 α se encuentra tanto en el epitelio como en células de la *lamina propria* (**Figura 19**). En los pacientes ACD, las células de *lamina propria* presentaron una marca abundante, especialmente en regiones próximas al epitelio apical. A su vez, los pacientes ACD presentaron un aumento significativo en el análisis de RFD para IL-1 α , tanto en el epitelio como en la mucosa total, mientras que en la *lamina propria* el resultado no fue significativo.

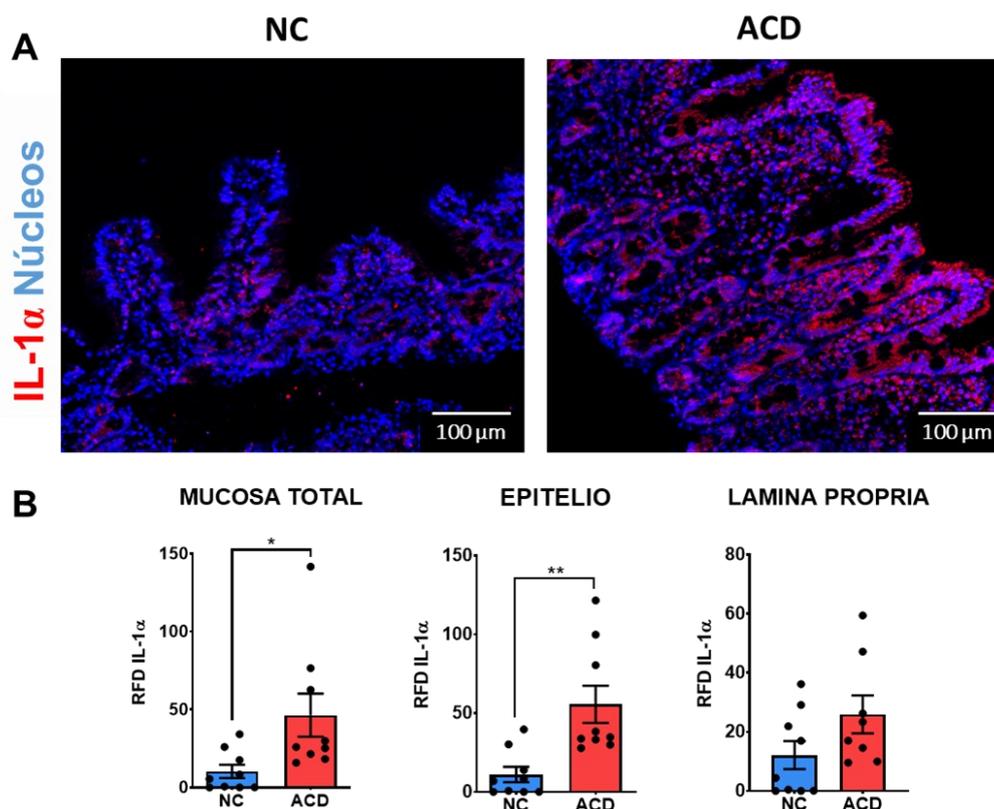


Figura 19- Análisis de la expresión de IL-1 α en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos. **A.-** Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de IL-1 α en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos (ACD) y controles no celíacos (NC). Las imágenes se obtuvieron con una magnificación total de 200X, se muestran barras blancas con las escalas correspondientes. **B.-** Análisis de RFD para IL-1 α en la mucosa total, el epitelio o la *lamina propria*, en ACD (n=9) y NC (n=9). Los diagramas de barras representan la media en su altura máxima para cada población y las barras oscuras el error estándar (SEM). En todos los casos se utilizó el ensayo estadístico de “test de Student” no pareado, con corrección de Welch si fuera necesaria (* p<0.05, ** p<0.01).

4.6.2 Análisis de las células IL-1 α ⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos

Con el fin de caracterizar la expresión de esta alarmina, se realizaron análisis por inmunofluorescencia con marcadores de diferentes linajes celulares como: CD45 (células de origen hematopoyético), CD3 (linfocitos T), CD31 (endotelio) y SMA

(miofibroblasto). La **Figura 20** muestra imágenes representativas de estas marcaciones donde se observa que las células CD45⁺ presentaron una tinción leve y difusa, preferentemente citoplasmática. Estas células CD45⁺IL-1 α ⁺ fueron encontradas principalmente en la *lamina propria*. Además, resulta interesante que se observaran numerosos enterocitos (células CD45⁻ IL-1 α ⁺) en el epitelio de los pacientes ACD (**Figura 20-B**). Por otro lado, prácticamente no se encontraron células CD3⁺IL-1 α ⁺. Mientras que algunos vasos (células endoteliales, CD31⁺) de la mucosa duodenal expresan IL-1 α de manera difusa en el citoplasma. Estos vasos se hallaron principalmente en la zona de contacto entre mucosa y submucosa. También encontramos que IL-1 α se expresa en varias células fusiformes SMA⁺, probablemente miofibroblastos, ubicados entre la mucosa y submucosa, rodeando las criptas epiteliales. Esto último resulta semejante a lo ya descrito para IL-33 siendo, tanto esta alarmina como IL-1 α , proteínas abundantes en las células mesenquimales intestinales. De este modo, podemos concluir que diversas células expresan IL-1 α en la mucosa intestinal en ACD, con una localización principalmente citosólica, siendo las células epiteliales las que más la expresan.

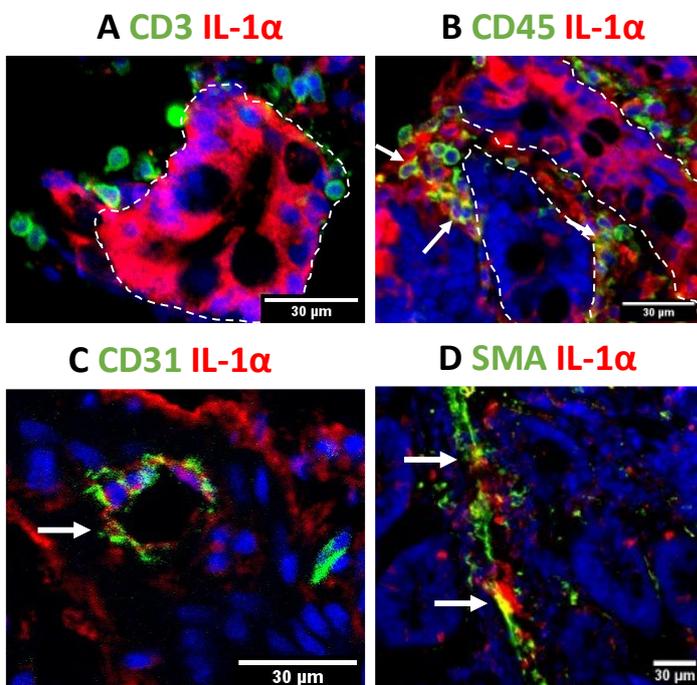


Figura 20- Patrón de expresión de IL-1 α en diferentes tipos de células en mucosa duodenal de pacientes ACD. Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia para IL-1 α (en rojo), núcleos (en azul) y diferentes marcadores de linaje celulares (verde). Los marcadores fueron: A.- CD3; B.- CD45, C.- CD31 y D.- SMA. En todos los casos se señalan algunas de las células doble positivas con una flecha blanca. Las zonas de epitelio fueron delimitadas con una línea blanca entrecortada.

4.6.3 Evaluación del nivel de expresión de IL-1 α en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC

En la **Figura 21**, se muestran los resultados del análisis por western-blot para IL-1 α en la mucosa duodenal de pacientes NC y ACD. Se identificaron tres versiones, o fragmentos, de la proteína, un fragmento de 36 kDa correspondiente a la pro-IL-1 α (versión “Full”), y dos versiones, producto de clivaje enzimático, una correspondiente a 20/19 kDa y otra de 17 kDa. Como se comentó en la introducción, estas últimas dos versiones son consideradas versiones maduras de la alarmina. La cuantificación de las bandas indicó una concentración similar de las tres versiones en las poblaciones de pacientes evaluadas (**Figura 21-B**). Sin embargo, un análisis de proporción de cada uno de los fragmentos mostró una caída sustancial en la expresión de la pro-IL-1 α , coexistente con un incremento de la proporción de la versión madura de 17 kDa (**Figura 21-C y D**). Si bien

estos resultados pueden deberse a una caída de la expresión de la versión full y a un leve incremento de la banda de 17 kDa, señalan que los pacientes celíacos activos presentan mayor disponibilidad de las versiones maduras de IL-1 α . Según bibliografía, la calpaína en el citoplasma y la quimasa en el medio extracelular podrían ser enzimas encargadas del clivaje que genera la versión de 17 kDa, mientras que la versión de 19/20 kDa puede generarse por granzima-B, caspasa-5, o elastasa de neutrófilos (Carruth, Demczuk and Mizel, 1991; Afonina *et al.*, 2015; Wiggins *et al.*, 2019). Por lo tanto, es posible que los procesos inflamatorios presentes en la mucosa de los pacientes ACD sean capaces de procesar la IL-1 α , incrementando la cantidad de IL-1 α madura.

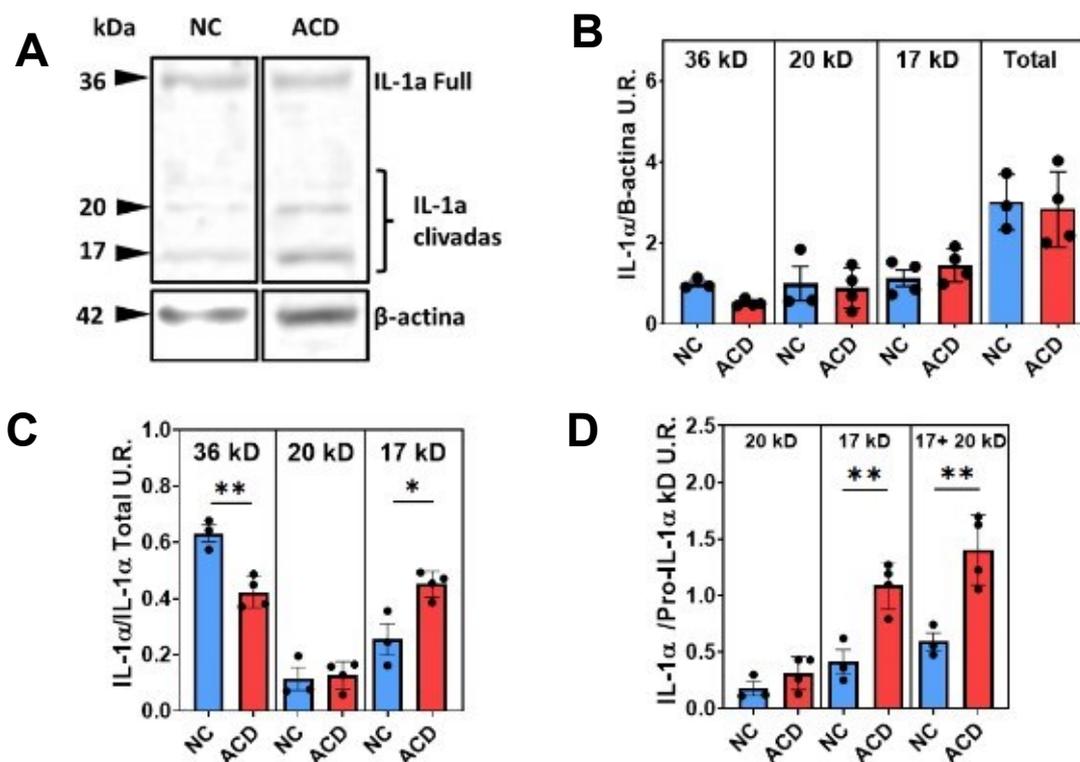


Figura 21- Análisis de western blot de IL-1 α en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. A.- Imágenes representativas del inmunoblotting de IL-1 α y el control de normalización de β -actina. Se muestran los pesos moleculares y la nomenclatura de cada uno de ellos. B.- Resultados del análisis de intensidad relativa de los tres fragmentos, y el total de IL-1 α normalizado con el control de β -actina, relativo a los controles (NC, n= 3; ACD, n= 4). C.- Resultados del análisis de intensidad relativa de los tres fragmentos relativo al total de IL-1 α (NC, n= 3; ACD, n= 4). D.- Resultados del análisis de intensidad relativa de las versiones clivadas relativas a la pro-IL-1 α (NC, n= 3; ACD, n= 4). Los análisis estadísticos utilizados fueron Test de Student no pareado para cada fracción (* p<0.05; ** p<0.01).

4.6.4 Evaluación del nivel de expresión transcripcional del sistema IL-1 α /IL-1R1 en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC

Prosiguiendo con el análisis del sistema de la alarmina IL-1 α , se midieron los niveles de los transcritos correspondientes a los genes que conforman parte del sistema: *IL1A*, *IL1R1*, *IL1R2*. En la **Figura 22**, se muestra un aumento en el nivel de expresión de *IL1A* e *IL1R2*, pero no de *IL1R1*, en los pacientes ACD respecto de los NC. Esta inducción en la expresión de la *IL1A* apoya lo observado en el análisis por RFD en secciones de las

biopsias intestinales de pacientes ACD, y al mismo tiempo, da sustento a la hipótesis de un mayor procesamiento de la pro-IL-1 α en los pacientes ACD.

Sin embargo, debido a que observamos un incremento en las versiones maduras de la Pro-IL-1 α resulta llamativo el aumento en la expresión del gen *IL1R2*, un factor inhibidor del procesamiento de esta alarina. No obstante, debemos considerar que existen diferentes procesos que permitirían la maduración de la IL-1 α en presencia de IL-1R2. Entre los antes discutidos, podemos considerar la activación de la caspasa-1, o el clivaje de la Pro-IL-1 α en membrana por enzimas extracelulares (Zheng *et al.*, 2013). Por ende, la existencia de estos fenómenos podría generar una mayor abundancia de versiones maduras de IL-1 α disponibles para activar diferentes células en el tejido.

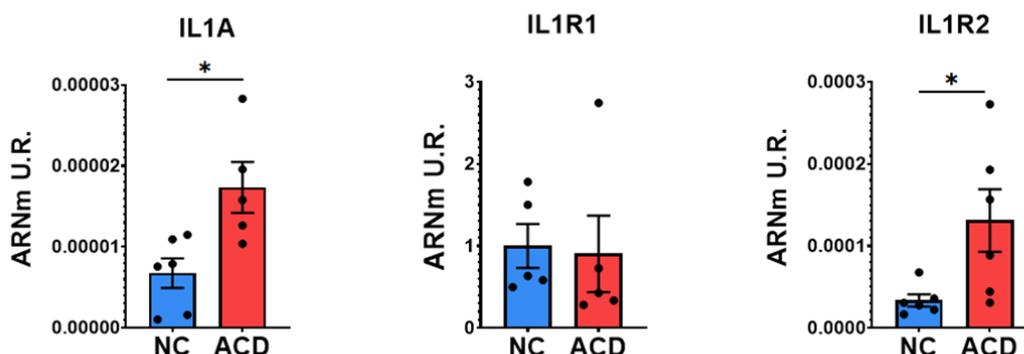


Figura 22- Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de expresión de factores del eje IL-1 α /IL1R1. Se muestran gráficos de barra más sus respectivos SEM. Los valores obtenidos para la muestra de cada paciente son representados como un círculo negro. Los transcritos analizados corresponden a las proteínas IL-1 α , IL-1R1 y IL-1R2. El análisis estadístico fue Test de Student con corrección de Welch si fuese necesario (* p < 0.05).

4.7 Resultados de la alarmina HMGB1

4.7.1 Análisis de la expresión de la alarmina HMGB1 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos

Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión de la proteína HMGB1 en la mucosa duodenal se realizó un análisis por inmunofluorescencias sobre cortes histológicos de la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC (**Figura 23**). Por lo mostrado en las imágenes de la **Figura 25-A** es evidente que HMGB1 presentó una localización

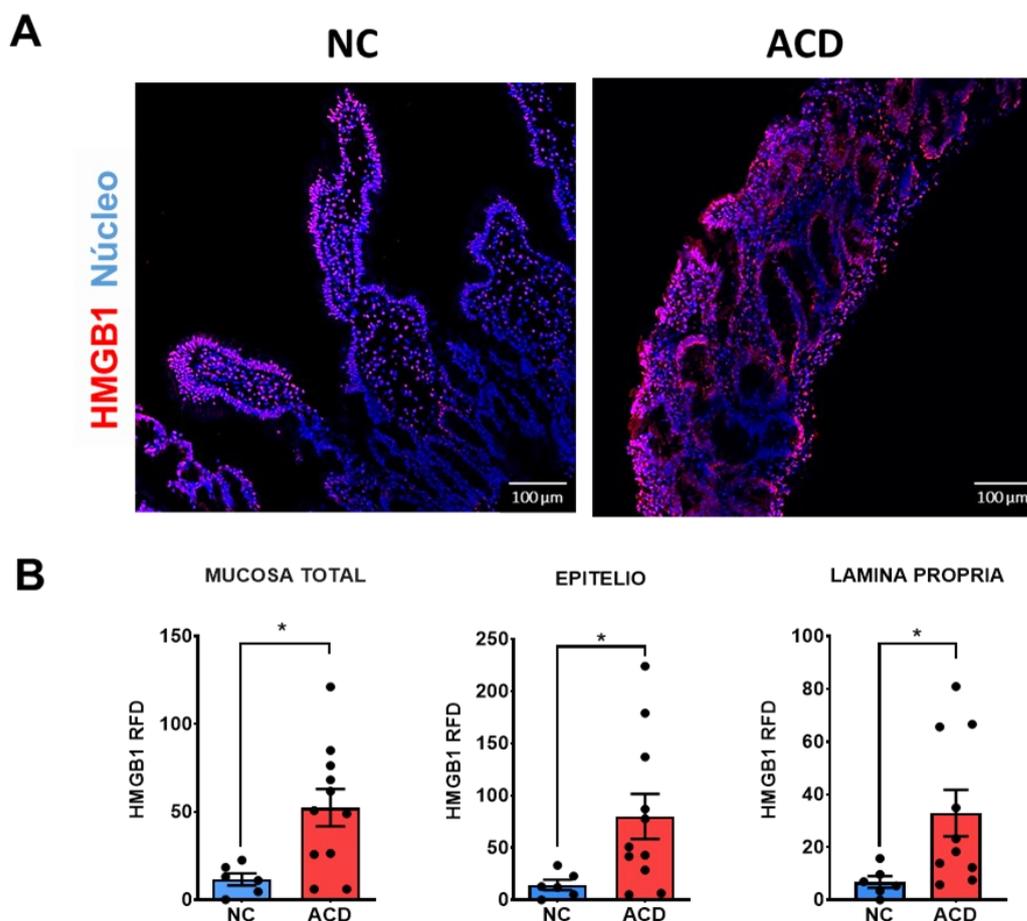


Figura 23- Análisis de la expresión de HMGB1 en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos y población control. A.- Imágenes representativas de las inmunofluorescencias para HMGB1 en los tejidos de pacientes ACD o NC. En todos los casos, HMGB1 se muestra en rojo y los núcleos en azul. Las imágenes fueron obtenidas con una magnificación final de 200X. **B.-** Valores de las mediciones de RFD en mucosa duodenal de los pacientes celíacos ACD (n= 11) y NC (n=6) para la mucosa duodenal completa, el epitelio o la *lamina propria*. Los diagramas de barras representan la media en su altura máxima para cada población y las barras oscuras el error estándar (SEM). En todos los casos se utilizó el ensayo estadístico de “test de Student” no pareado, con corrección de Welch si fuera necesaria (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

principalmente nuclear. Sin embargo, en ciertas regiones de la mucosa (**Figura 25-B**), las células mostraron una marca con predominancia citosólica. Esta localización se encontró en solo algunas células epiteliales y de la *lamina propria*. Aunque es de notar que dicha marca resultó ser más evidente en los tejidos de los pacientes celíacos activos. El análisis

de densidad de intensidad de fluorescencia muestra que los pacientes ACD presentan un aumento de la proteína en toda la mucosa. Por otro lado, evidenciamos que distintas células, entre ellas células leucocitos (CD45⁺), linfocitos T (CD3⁺), y células miofibroblastos (SMA⁺), expresan HMGB1 (**Figura 24**), aunque la intensidad de la marca fue menor que la observada en las células epiteliales.

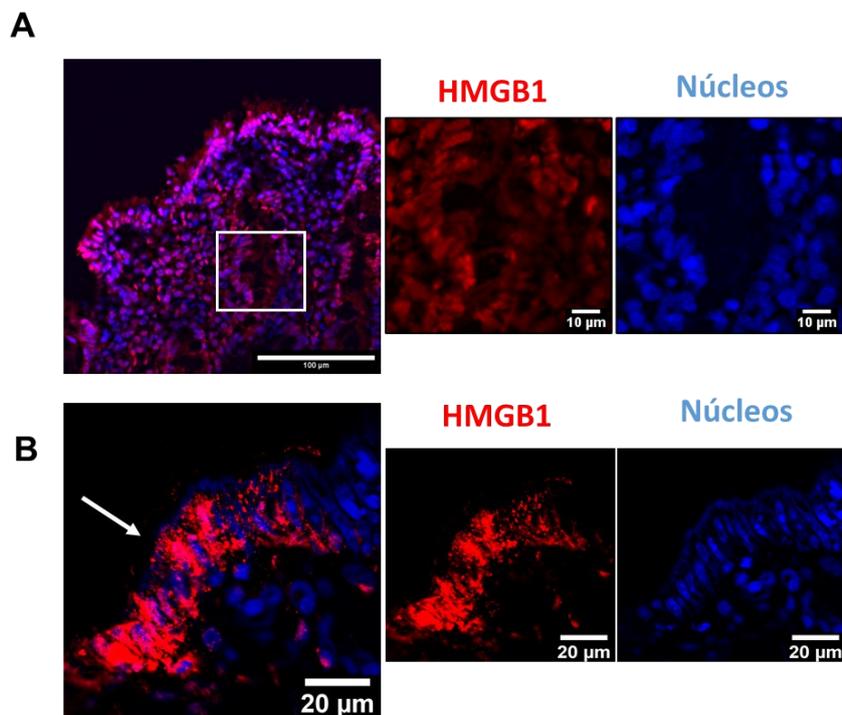


Figura 25- Localización en núcleo y citoplasma de HMGB1. Imágenes representativas de inmunofluorescencia para HMGB1 de la mucosa duodenal de dos pacientes ACD. **A.-** El recuadro blanco indica la región de la mucosa duodenal a estudiar en las imágenes subsecuentes. Se aprecia una marca tanto nuclear como citosólica. **B.-** Se muestra una región del epitelio (señalada con una flecha blanca), donde la localización de HMGB1 es principalmente citosólica.

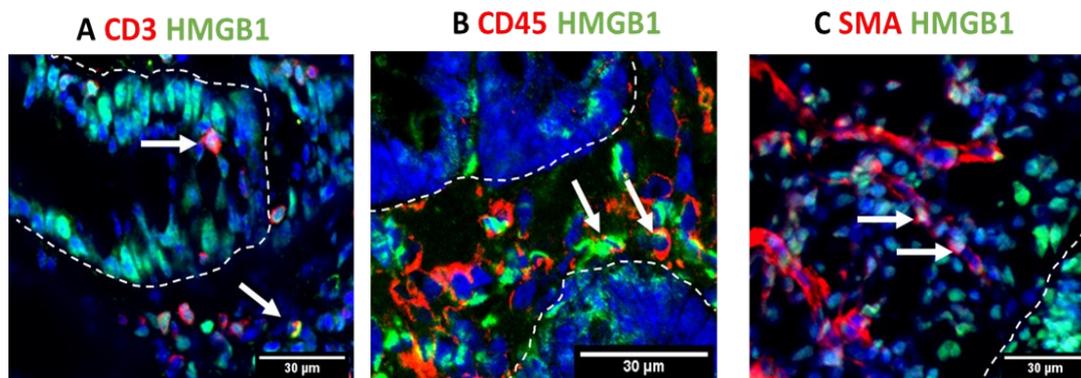


Figura 24- Patrón de expresión de HMGB1 en diferentes tipos de células en mucosa duodenal de pacientes ACD. Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia para HMGB1 y CD3 (**A**), HMGB1 y CD45 (**B**), HMGB1 y SMA (**C**). Con flechas se indican células doble positivas para los marcadores y se demarca el epitelio con una línea entrecortada.

4.7.2 Análisis de la expresión transcripcional de los factores del eje HMGB1/RAGE en intestino delgado humano

El análisis por RT-qPCR mostró que los pacientes celíacos activos presentan un aumento en el nivel de expresión de RAGE, pero no de su ligando HMGB1 (**Figura 26-A**). Esto resulta particularmente interesante ya que RAGE es uno de los receptores más relevantes en la respuesta inflamatoria mediada por HMGB1. Curiosamente, encontramos que los niveles relativos en la expresión de este receptor correlacionaban positivamente con los niveles de expresión del gen *IFNG* (**Figura 26-B**). Esto último es llamativo dado que existen evidencias en pacientes con esclerosis múltiple donde el tratamiento con IFN β es capaz de inducir la expresión de RAGE (Asadikaram *et al.*, 2017). En este caso, los pacientes celíacos no presentaron una correlación entre RAGE e IFN β , pero si con si con IFN γ . Dado que no encontramos una correlación entre IFN γ e IFN β en nuestra población de pacientes, y que la vía de señalización entre IFN γ es similar a la de IFN β , estos resultados podrían sugerir un posible control de la expresión de RAGE mediado por IFN γ . Sin embargo, nuevos experimentos son necesarios para confirmar dicha sospecha.

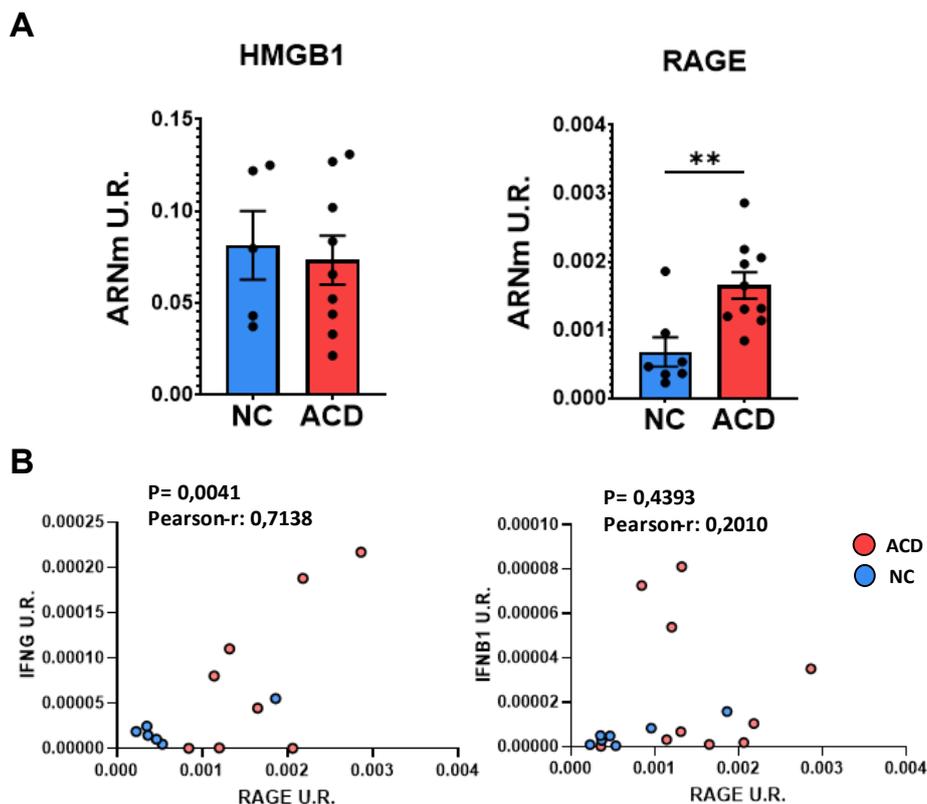


Figura 26- Medidas de expresión relativa de genes correspondientes al sistema HMGB1/RAGE. A.- Gráficos de barra con sus SEM sobre los niveles de expresión relativos de las proteínas HMGB1(NC, n= 5; ACD, n=9) y RAGE (Gen: *AGER*) (NC, n= 7; ACD, n=10). El análisis estadístico es test de Student, (**) p-valor <0.01. B.- Correlación entre los niveles relativos de ARNm de los genes *IFNG*, *IFNB1* y *AGER*. El análisis estadístico es por Pearson, se encuentran indicados el p-valor, y el r de Pearson de cada correlación.

4.7.3 Análisis de expresión de HMGB1 por western blot

El análisis por western blot permitió la evaluación del nivel de expresión de HMGB1 en biopsias duodenales de pacientes ACD y NC. En la **Figura 27**, se observa un incremento en la expresión de la banda de 25 kDa correspondiente a la versión no clivada de HMGB1 en la población celíaca activa. Este hallazgo se corresponde a lo mostrado en el análisis por RFD (**Figura 23**).

En conjunto, las diferentes metodologías empleadas indican que se produce una inducción de la alarmina HMGB1 y su receptor RAGE en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos.

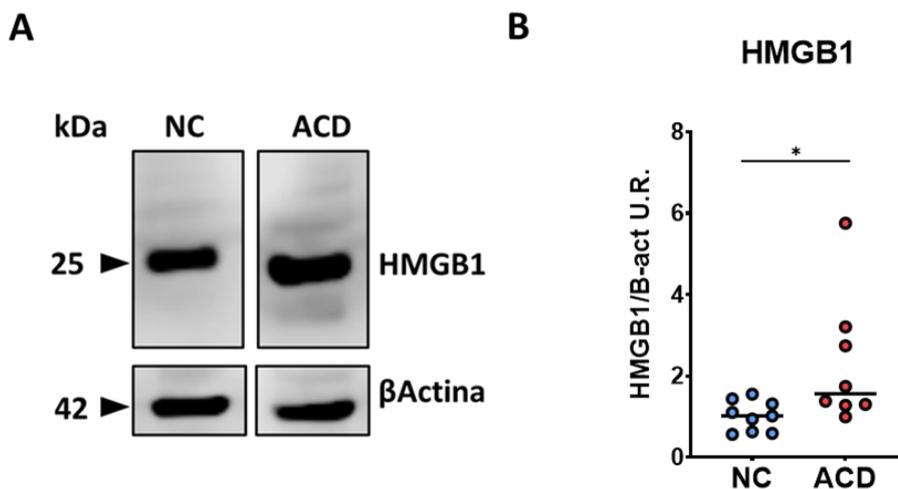


Figura 27-Análisis de western blot de HMGB1 en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. **A.-** Imágenes representativas del análisis por western blot para HMGB1 en pacientes no celíacos (NC) y pacientes celíacos activos (ACD), con las correspondientes marcas de peso molecular en kDa. HMGB1 mostró una banda clara a los 25kDa. En la porción inferior se muestra el western blot correspondiente β -Actina utilizado como para normalizar. **B.-** Análisis de la expresión de HMGB1 en pacientes NC (n= 9), y ACD (n=7). El gráfico muestra los valores de la relación intensidad de HMGB1 vs intensidad de β -Actina normalizado a los controles de cada corrida. El gráfico también muestra una barra media correspondiente a la mediana de cada población. Dado que los análisis de normalidad sugieren un análisis no paramétrico, el análisis estadístico usado fue Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

4.8 Discusión y perspectivas

En esta parte, hemos analizado la expresión de tres alarminas en la mucosa duodenal humana, en particular, comparando tejido proveniente de pacientes con EC al diagnóstico y población control. Empleando distintas estrategias, demostramos que IL-33, IL-1 α y HMGB1 están incrementadas en la mucosa duodenal de pacientes con enteropatía. A su vez, en el caso de IL-33 encontramos una mayor concentración en el suero de pacientes celíacos activos. Por otro lado, demostramos que para IL-33 e IL-1 α se encuentra un aumento de diferentes versiones generadas por digestión enzimática, las que han sido asociadas a una mayor actividad biológica.

Hemos observado que diferentes tipos celulares producen IL-33 en la mucosa duodenal, entre ellas: células epiteliales, endoteliales, y algunas células mononucleares de *lamina propria*, como lo son las células B (CD20⁺), y macrófagos (CD64⁺). Esto es interesante, ya que se ha comprobado que IL-33 es capaz de ser liberada por estas células por medio de mecanismos diferentes (Guo *et al.*, 2019; Riegler *et al.*, 2019; Shlomovitz *et al.*, 2019). Para el caso de las células epiteliales, célula endoteliales y los fibroblastos, la necroptosis y necrosis han sido los mecanismos más estudiados (Negroni *et al.*, 2017; Orning *et al.*, 2018; Shlomovitz *et al.*, 2019). En el caso de las células mononucleares de *lamina propria*, la liberación de IL-33 puede estar asociada a mecanismos de secreción sin involucrar muerte celular u otros también asociados a necroptosis. En especial, se reportó la liberación de IL-33 por células PBMC estimuladas con péptidos de gliadinas (López-Casado *et al.*, 2017). De esta forma, aún células circulantes, como linfocitos B y monocitos podrían ser responsables de la liberación de IL-33 en respuesta a la estimulación con péptidos de gliadinas en pacientes celíacos. En base a nuestras observaciones, resulta interesante estudiar qué poblaciones en el tejido y en circulación podrían liberar IL-33, como también IL-1 α y HMGB1, y evaluar las señales que participan en estos procesos.

Desde la biología del sistema, es sumamente interesante el hallazgo de fragmentos de clivaje proteolítico de IL-33 que, lejos de generar versiones degradadas, son fragmentos que conservan su actividad o, como se ha demostrado, pueden tener incluso mayor actividad que la versión nativa. Es así, que dependiendo de la célula y el medio en el que se encuentren, diferentes enzimas pueden generar fragmentos con distinta actividad biológica. Dado que hemos encontrado aumento de las fracciones de 21/20 kDa y 18 kDa en duodeno de EC, pensamos que estos mecanismos proteolíticos se encuentran exacerbados en la enteropatía. Trabajos realizados sobre IL-33, indican que dichos fragmentos pueden ser producidos por enzimas (como elastasa, catepsina G, triptasa, quimasa, granzima B) que son secretadas por neutrófilos, mastocitos y células citotóxicas en condiciones inflamatorias diversas (Lüthi *et al.*, 2009; Lefrançais *et al.*, 2012; Lefrançais *et al.*, 2014). Estas células constituyen parte del infiltrado inflamatorio característico de la enteropatía celíaca (Diosdado *et al.*, 2007; Frossi *et al.*, 2017; Jabri and Sollid, 2017), siendo potenciales fuentes de enzimas que incrementen la actividad biológica de la IL-33 liberada.

Como mencionamos, IL-33 tiene un receptor, ST2, que aparece como receptor de superficie ST2L y como versión soluble ST2s. Si bien, los resultados obtenidos por ELISA indican un aumento del receptor soluble ST2s libre en circulación, el análisis por western blot reveló que esta versión inhibitoria de la IL-33 coexistía con un aumento del receptor de membrana ST2L. De esta forma, no encontramos diferencias en los niveles relativos de ambas proteínas entre los pacientes celíacos y los controles. Por lo tanto, estas

observaciones sugieren que el ambiente proinflamatorio en la enteropatía, donde encontramos formas fragmentadas que conservan actividad, la IL-33 liberada puede tener un rol relevante.

Para evaluar el rol funcional de IL-33 estudiamos qué poblaciones celulares expresan ST2 en la mucosa duodenal. Entre las células positivas para ST2 encontramos células CD3⁺ y CD8⁺. Consideramos un hallazgo relevante que en los pacientes celíacos activos se encuentren que 10-20% de células T CD8⁺ sean ST2⁺, mientras que fueron menos del 5% en los controles. Curiosamente, la IL-33 es capaz de inducir un fenotipo citotóxico en las células T CD8⁺. En especial, es capaz de inducir mayor expresión de IFN γ , BLIMP1, y mayor capacidad para eliminar células tumorales, denotando una mayor actividad citotóxica (Yang *et al.*, 2011; Baumann, W. V. Bonilla, *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015). Por lo tanto, es posible que IL-33 potencie la actividad citotóxica en EC. Aunque también debemos considerar que existen otras poblaciones de células inmunes que expresan el receptor ST2, las cuales pueden cumplir un rol contrapuesto. En este sentido, las células Th2, Treg y ILC2, pueden actuar como antagonistas de las respuestas Th1/17 y citotóxicas. De esta forma, la comprensión del rol de la IL-33 requerirá de nuevos abordajes experimentales de los mecanismos y señales que median la liberación de IL-33 como también de las poblaciones blanco de esta citoquina/alarmina.

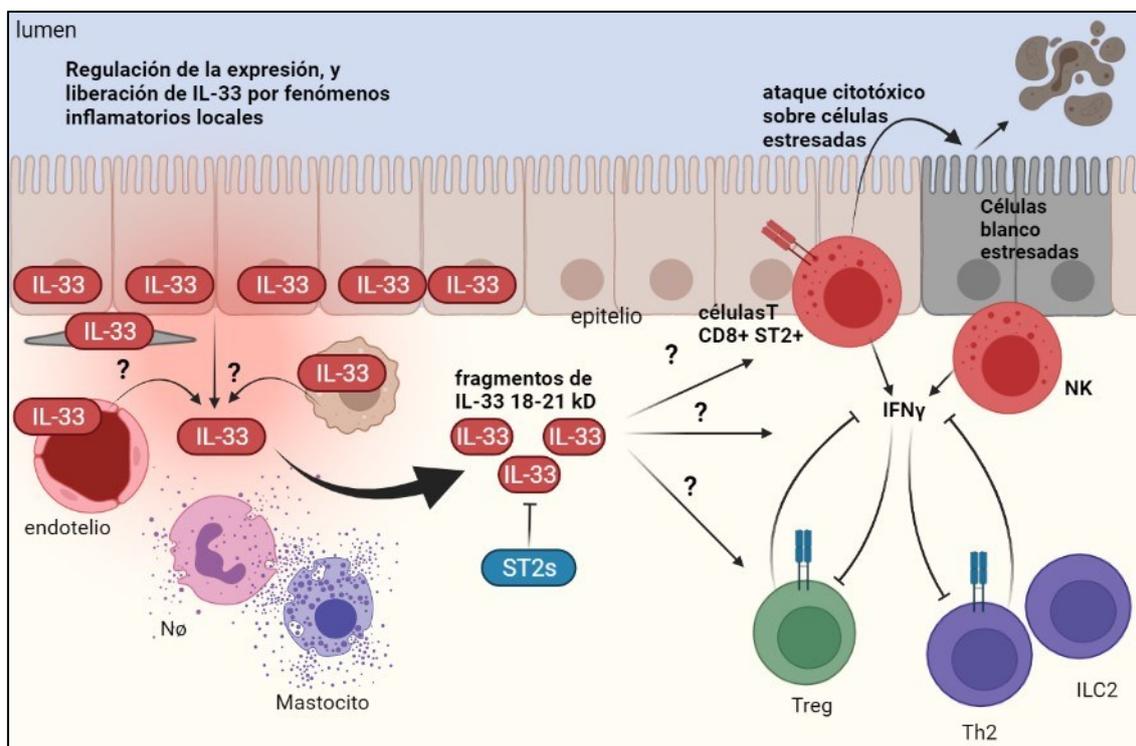


Figura 28- Resultados y nuevas hipótesis sobre el eje IL-33/ST2 en la EC. En la infografía se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos sobre este eje, y con signos de pregunta “?” los pasos que son objeto de nuevas hipótesis derivadas de los resultados.

Ha sido un hallazgo relevante la asociación entre EC y las otras dos alarminas, IL-1 α y HMGB1. A diferencia de IL-33, estas alarminas se encuentran expresadas por una variedad de células en la mucosa duodenal y al liberarse favorecen la producción de respuestas inflamatorias de tipo 1 siendo incluso capaces, como en el caso de IL-1 α , de bloquear la actividad supresora de las Treg.

En este estudio, observamos un incremento de IL-1 α tanto por análisis de inmunofluorescencia como por RT-qPCR. Curiosamente, los análisis de RT-qPCR mostraron un incremento en el nivel de expresión de IL-1R2, un receptor que bloquea el clivaje de IL-1 α por la calpaína y promueve su acumulación citosólica en pacientes ACD. Aunque esto podría ser considerado como una inhibición de la bioactividad de IL-1 α , estudios recientes sugieren un rol promotor de IL-1R2 en la localización en membrana de esta alarmina. Por lo cual, la actividad de IL-1 α podría no está limitada solo a su liberación, sino que también podrían tener un rol en la membrana celular (Chan *et al.*, 2020).

Aunque no pudimos determinar IL-1 α libre en plasma de pacientes ACD, el análisis por western blot de proteínas extraídas de las biopsias mostró un resultado similar que el descrito para IL-33, con versiones procesadas o “maduras”, en particular la de 17 kDa que se encuentra incrementada en la mucosa duodenal en EC, y tiene actividad biológica. Si bien no tenemos información sobre qué enzima es responsable de generar el fragmento de 17 kDa, como ya se comentó, tanto la quimasa de mastocitos o la calpaína intracelular son capaces de generar dicha proteólisis. Ambos procesos enzimáticos son sustancialmente distintos, dado que el primero depende de la desgranulación de los mastocitos, proceso asociado a la EC activa (Frossi *et al.*, 2017), y el otro, es un proceso intracelular dependiente de Ca²⁺ citosólico. Es interesante mencionar que estudios recientes han mostrado que los procesos de muerte celular programada (piroptosis y necroptosis) median un ingreso de Ca²⁺ en el citosol de forma rápida a través de poros en la membrana plasmática (Tsuchiya *et al.*, 2021). Dicho evento, podría mediar la activación de la calpaína y la consecuente generación del fragmento de 17 kDa de la IL-1 α . Esto puede relacionarse con la actividad de IL-1R2, que evita el procesamiento de la pro-IL-1 α , pero contribuye al acumulo de ésta en citosol. Esta vinculación puede ser relevante si consideramos que, en la piroptosis, la caspasa-1 activada es capaz de procesar a la IL-1R2 y dejar a pro-IL-1 α disponible para el procesamiento por la calpaína (Zheng *et al.*, 2013). En nuestro grupo, hemos observado que en los pacientes ACD la piroptosis es un proceso activo donde caspasa-1 y 4 están activas. Es por ello, que pensamos que los procesos de muerte celular programada por piroptosis sumado a la desgranulación por granulocitos y células NK, serían claves para potenciar la actividad de la vía de IL-1 α en los pacientes celíacos. Esta citoquina no solo tiene la capacidad de señalizar una vez liberada al medio extracelular, sino desde su localización en membrana, fenómeno que podría ser promovido por IL-1R2, el cual no ha sido evaluado aún. A su vez, la pro-IL-1 α podría ser digerida por proteasas liberadas por células citotóxicas, mastocitos o neutrófilos, que se encuentran asociadas a la EC no tratada (Meresse *et al.*, 2006; Diosdado *et al.*, 2007; Frossi *et al.*, 2017; Jabri and Sollid, 2017). Nuevos estudios de citometría de flujo, actividad enzimática y western blot sobre piezas de biopsia duodenal serán necesarios para avanzar en el conocimiento de estas vías.

En este estudio, demostramos que IL-1 α se expresa en diversas células de la mucosa intestinal, como células mesenquimales, miofibroblastos (SMA⁺), células endoteliales (CD31⁺), epiteliales (CD45⁻) y leucocitos de *lamina propria* (CD45⁺). Esta variedad de células sugiere la existencia de diferentes mecanismos de liberación o localización intracelular. Por ello, nuevos estudios destinados a identificar las células y los procesos de muerte permitirían conocer el mecanismo de liberación de IL-1 α .

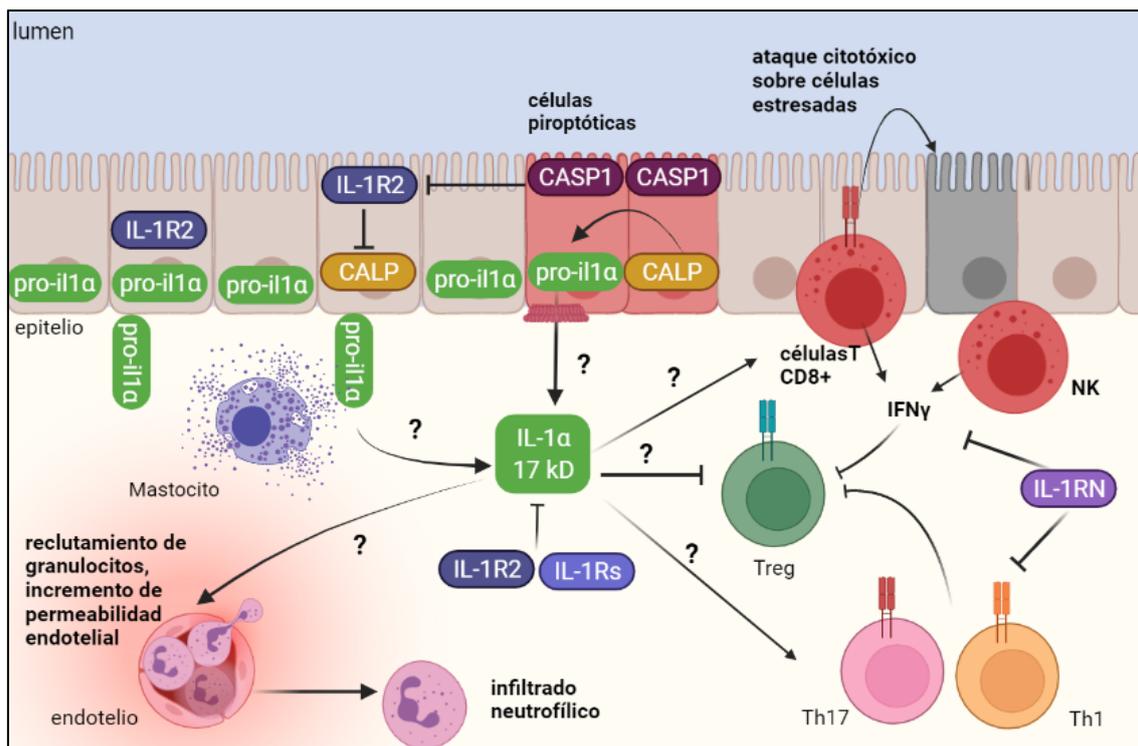


Figura 29- Resultados y nuevas hipótesis sobre el eje IL-1 α /IL1R en la EC. En la infografía se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos sobre este eje, y con signos de pregunta “?” los pasos que son objeto de nuevas hipótesis derivadas de los resultados. CASP1: Caspasa 1, CALP: Calpaína. La imagen de Pro-IL1 α vertical alude a su versión en membrana.

En el estudio de HMGB1, por medio de análisis por inmunofluorescencia y western blot, encontramos un incremento en la expresión en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos. De forma semejante a lo encontrado para IL-33 e IL-1 α , HMGB1 se localizó principalmente en el núcleo y eventualmente en citoplasma de células epiteliales, mesenquimales (SMA⁺) y linfocitos T (CD45⁺, CD3⁺) en muestras duodenales de pacientes ACD y NC, siendo mayor la expresión en los primeros. Para su receptor RAGE, el análisis por RT-qPCR mostró niveles incrementados en ACD, y que a su vez correlacionaban con los niveles de transcritos del gen *IFNG* (Nilsen *et al.*, 1998; Wapenaar *et al.*, 2004). Esto puede ser relevante ya que el rol proinflamatorio de la vía HMGB1/RAGE se observó en modelos inflamatorios, como enfermedades cardiovasculares o sepsis, donde RAGE facilita la inducción de piroptosis, por medio de la vía dependiente de caspasa-4/5 en células como, por ejemplo, macrófagos, potenciando el contexto inflamatorio (Deng *et al.*, 2018). Al mismo tiempo, HMGB1 es capaz de potenciar la respuesta inflamatoria por LPS, así como también por otros MAMPs y citoquinas como: IL-1, CXCL12 (Harris, Andersson and Pisetsky, 2012). De esta forma, HMGB1 promueve respuestas M1 en macrófagos (Schaper *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020), y estimula la proliferación de linfocitos T (Harris, Andersson and Pisetsky, 2012). Es claro, que al igual que para IL-1 α , el rol de HMGB1 como alarmina depende de la concentración local y sistémica, y en el tejido de qué células expresen el receptor. En este sentido, en población celíaca pediátrica se encontró un incremento en los niveles plasmáticos y fecales de HMGB1 (Manti, Cuppari, Parisi, *et al.*, 2017; Manti, Cuppari, Tardino, *et al.*, 2017). Es por ello, que debemos considerar un potencial rol del eje HMGB1/RAGE en la modulación de la respuesta inflamatoria en la enteropatía celíaca.

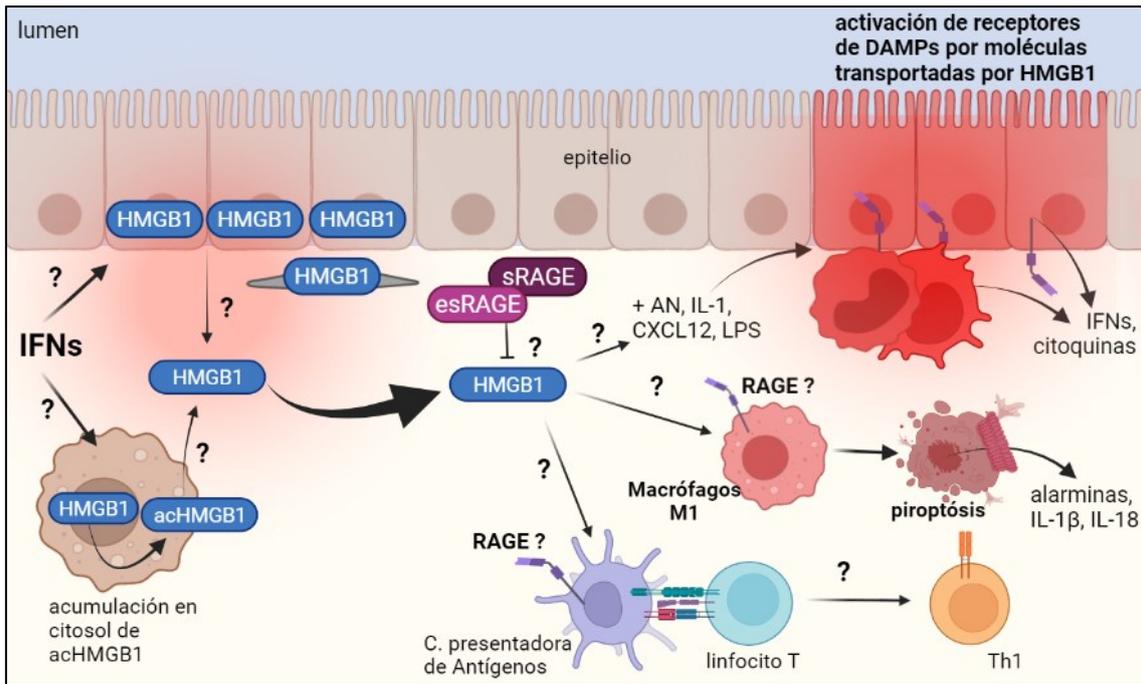


Figura 30- Resultados y nuevas hipótesis sobre el eje HMGB1/RAGE en la EC. En la infografía se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos sobre este eje, y con signos de pregunta “?” los pasos que son objeto de nuevas hipótesis derivadas de los resultados. Para el caso del receptor RAGE, el símbolo “RAGE ?” alude a la posibilidad que este se exprese en mayores cantidades en ciertas células. acHMGB1: HMGB1 hiperacetilada, AN: Ácidos Nucleicos libres, LPS: lipopolisacárido.

Como parte de un estudio en curso en nuestro grupo, hemos observado la inducción de marcadores de muerte celular proinflamatoria en mucosa duodenal de pacientes ACD. En particular, como evidencia de piroptosis se observó caspasa-1 activa y fragmentos N-terminal de GSDMD, mientras que los marcadores de necroptosis encontrados fueron RIPK3 y pMLKL. Estas vías de muerte podrían ser el mecanismo principal de liberación de IL-1 α , HMGB1 e IL-33, por células epiteliales y leucocitos en *lamina propria*. Estudios futuros estarán orientados a caracterizar los mecanismos de liberación de las alarminas, y estudiar su rol funcional en células aisladas de la mucosa duodenal.

4.9 Conclusiones

La expresión de las alarminas IL-33, IL-1 α y HMGB1, y los receptores, ST2 y RAGE se encuentra aumentada en la enteropatía de los pacientes celíacos, sugiriendo un posible rol en la patogenia de la enfermedad celíaca.

La expresión de las alaminas es muy diversa, encontrándose tanto en células estromales, epiteliales, y en células que componen el infiltrado inflamatorio en duodeno de los pacientes celíacos. Esto sugiere que los fenómenos de liberación de estas proteínas pueden ser diversos según el tipo celular en cuestión. Es destacable que las mayores diferencias a nivel de expresión de estos sistemas de proteínas se observaran en la barrera epitelial, o en sus cercanías. Por ende, se puede considerar que los inductores de la expresión y liberación de las alarminas están relacionados con factores provenientes del lumen intestinal. Entre estos, no solo pueden afectar el propio consumo de gluten, y la reacción inflamatoria consecuente, sino también metabolitos, y macromoléculas derivadas de la microbiota intestinal.

El receptor ST2 tiene una expresión localizada en las células T CD8⁺, lo que vincula la liberación de IL-33 con la activación de células citotóxicas localizadas en la mucosa inflamada. De todas formas, se requieren de nuevos estudios para evaluar la expresión de ST2 en poblaciones con roles tolerogénicos, y células relacionadas con la inmunidad tipo 2.

La alarmina IL-33 es liberada en mayores cantidades en los pacientes celíacos, con mayores niveles circulantes y liberación en el tejido. Es de destacar el hallazgo de fragmentos de IL-33, posiblemente debidos a enzimas extracelulares, que pueden presentar actividad biológica. Esto sugiere que el ambiente inflamatorio local puede promover una mayor actividad biológica de IL-33.

Análogo a lo encontrado para IL-33, IL-1 α mostró un incremento relativo en la versión madura de 17 kDa. Esto resalta la importancia del medio inflamatorio local, tanto extracelular, con la presencia de enzimas liberadas por degranulación, como la potencial activación de la calpaína en el ambiente intracelular.

La proteína HMGB1 se encontró incrementada en los pacientes celíacos no diagnosticados, localizándose en el núcleo y citosol, lo que sugiere una posible liberación al medio extracelular. A su vez, encontramos una inducción en la expresión de su receptor, RAGE, el cual parece asociarse con los niveles de expresión del gen *IFNG*. Esto indicaría que el eje HMGB1/RAGE puede ser relevante en la inducción de una respuesta proinflamatoria local en la mucosa duodenal celíaca.

Debemos mencionar la necesidad de nuevos estudios para la evaluación de la expresión de HMGB1 e IL-1 α en los pacientes celíacos para poder constatar su liberación durante la enteropatía.

5 Parte B: Análisis de expresión de mediadores inflamatorios en mucosa duodenal

5.1 Introducción general

En esta parte, se realiza un estudio de algunas de las vías clásicas tanto pro- o antiinflamatorias en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos. Este estudio contribuye a la mejor comprensión de las señales participantes en el desarrollo de la patogenia, pero también en su reconocimiento como posibles blancos terapéuticos.

Existen diferentes mediadores inflamatorios que mediante diversos mecanismos condicionan las respuestas sistema inmune en todo el organismo. En particular, el intestino es un sitio de encuentro del sistema inmune, la microbiota y los alimentos digeridos. De esta forma, es un lugar donde deben coexistir señales pro- y antiinflamatorias, con la intención de preparar una respuesta a eventuales patógenos y, al mismo tiempo, desarrollar una respuesta regulatoria frente a componentes inocuos presentes en el lumen intestinal. Como se comentó en la introducción, los pacientes celíacos activos presentan una enteropatía, de grado variable, que eventualmente conlleva la malabsorción, que puede ocasionar consecuencias a largo plazo. Al mismo tiempo, este desbalance conlleva en algunos casos a desarrollar patologías autoinmunes asociadas, como la Diabetes Mellitus tipo 1, Artritis reumatoidea, Tiroiditis autoinmune, entre otras.

Durante las últimas décadas, el estudio de la enfermedad celíaca, la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome del intestino irritable, y otras entidades localizadas en el intestino, ha generado una mayor comprensión, aunque no completa, de las causas de estas patologías. Dado que existen señales y mecanismos por explorar, nuestro objetivo fue estudiar diferentes señales y factores que se agruparon de la siguiente manera:

- Interferones tipo I.
- Interferones tipo III.
- Interferones tipo II.
- Factores reguladores de IFNs (IRFs).
- Interleuquina 17 y 21.

5.2 Vía de los Interferones

5.2.1 Interferones tipo I

En humanos existen 17 tipos de Interferones (IFNs) tipo I: 13 IFNs tipo alfa, 1 IFN beta, 1 IFN épsilon, 1 IFN kappa y 1 IFN omega. Todos estos genes están presentes en el cromosoma 9; sin embargo, desde el punto de vista de la secuencia primaria no suelen compartir gran homología primaria (Pestka, Krause and Walter, 2004). A pesar de ello, las proteínas son estructuralmente muy similares, compartiendo motivos tipo alfa hélice análogos a otros miembros de la clase II de las citoquinas. Su agrupación conjunta se justifica por su capacidad de señalización por el mismo receptor celular, el IFNAR. Los IFNs tipo I, presentan una diversidad de funciones redundantes entre ellos. Sin embargo, debido a diferencias en sus sitios promotores y afinidades con el receptor se explican algunas diferencias funcionales entre diferentes tejidos y células (Schreiber, 2017).

Los IFNs tipo I, son secretados por prácticamente todas las células nucleadas (González-Navajas *et al.*, 2012). No obstante, se sabe que las células dendríticas plasmocitoides (pDC) son fuertes productores de estas proteínas. Si bien, en el momento de su descubrimiento, se los reconoció como factores solubles inductores de resistencia a

infecciones virales (Isaacs and Lindenmann, 1957), hoy en día, se sabe que su producción se incrementa durante infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias. Al mismo tiempo, se sabe que participan en situaciones no infecciosas, como lo son tumores, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias (González-Navajas *et al.*, 2012). Por todo ello, se deduce que existe una gran cantidad de estímulos capaces de inducir la transcripción de los genes de IFNs. Para que ocurra esto, se requiere de la activación de los factores reguladores de los IFNs (IRFs) 3 y 7, a través de diferentes tipos de receptores celulares. La activación de estos factores induce su la translocación al núcleo, la cual en presencia de la vía NF- κ B activa, logra activar la transcripción de los diferentes genes *IFNA* e *IFNB1* (Schafer *et al.*, 1998). De esta forma, un gran número de señales logran activar la producción de los IFNs I (**Tabla 14**). Las vías más comunes de activación implican diversos receptores, todos ellos sensibles a diferentes moléculas de tipo ácidos nucleicos, y LPS: TLRs (3, 4, 7, 8 y 9), cGAS-STING, ALRs (“Receptores tipo AIM2”: IFI16, ZBP1), RLRs (“Receptores tipo RIG-I”: RIG-I y MDA-5), entre otros (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014). Estos receptores detectan diferentes moléculas activadoras, lo que explica la aparición de los IFNs tipo I en diversas situaciones patológicas.

Agonista	Receptor	Localización celular	Vía/ Fact. Transcripción	Referencia
ARNss	TLR7	Vesículas	MYD88/TBK1/NF κ B/IRF3,5,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007)
ARNds	TLR3	Vesículas	TRIF/TBK1/NF κ B/IRF3,5,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007)
ARNds corto	RIG-I	Citosol	MAVS/TBK1/NF κ B/IRF3,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007)
ARNds largo	MDA-5	Citosol	MAVS/TBK1/NF κ B/IRF3,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007)
ADN	TLR9	Vesículas	MYD88/TBK1/NF κ B/IRF3,5,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007)
ADNds	RNA pol. III	Citosol	RIGI/MAVS/TBK1/NF κ B/IRF3,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007; Chiu, MacMillan and Chen, 2009)
ARN rico en "GU"	TLR8	Vesículas	MYD88/TBK1/NF κ B/IRF3,5,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007)
ADNds	ZBP1 (DAI)	Citosol	TBK1/IRF3 y ZBP1/RIPK1/RIPK3/NF κ B	(Takaoka <i>et al.</i> , 2007; Rebsamen <i>et al.</i> , 2009)
ADNds	IFI16	Citosol	TBK1/IRF3,7/NF κ B	(Unterholzner <i>et al.</i> , 2010)
LPS	TLR4	Membrana	TRIF y MYD88/TBK1/NF κ B/IRF3,5,7	(Noppert, Fitzgerald and Hertzog, 2007)
ADNss/dc	cGAS-STING	Citosol	TBK1/IRF3/NF κ B	(Zhu <i>et al.</i> , 2019)

ADN	DNA-PK (Ku90)	Citosol	TBK1/IRF3/NFkB	(Ferguson <i>et al.</i> , 2012)
-----	------------------	---------	----------------	---------------------------------

Tabla 14- Resumen de vías receptores de DAMPs inductores de IFNs por vía NF-kB/IRFs.

Una vez producidos, los IFNs tipo I son capaces de unirse a una de las 2 cadenas de su receptor, IFNAR, denominadas IFNAR-1 o 2, expresados por prácticamente todas las células nucleadas. La unión con una de las cadenas permite que se incremente la afinidad por la otra cadena. Una vez conformado el heterodímero, se produce la señalización intracelular dependiente de las quinasas JAK1 y TYK2. Estas quinasas desencadenan la posterior fosforilación de diferentes factores intracelulares, STAT1, 2, 3, 5, y dependiendo de la célula, también STAT4 y 6 (Platanias, 2005). La fosforilación de STAT1 y 2 conlleva a su dimerización y reclutamiento del factor IRF-9, conformando el complejo “factor genético 3 estimulado por IFN” (ISGF3). Este complejo migra al núcleo, en donde se une a elementos de respuesta a la estimulación por IFN (ISRE), los cuales se encuentran en promotores de genes estimulados por IFN (ISG) (Platanias, 2005; Schneider, Chevillotte and Rice, 2014). Entre los ISG, se encuentran genes involucrados en la respuesta a virus: MX1, MX2, TRIM, Viperina, reguladores positivos de la vía como: STAT1 y2, cGAS, AIM2, IFI16, RIG-I, MDA-5, IRF1,3,7 y 9, y reguladores negativos de la vía: SOCS-1,-3 y USP18 (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014).

Por otro lado, las moléculas STAT1 pueden homodimerizarse entre sí y unirse los sitios inducidos por IFN γ (GAS) (Platanias, 2005). Más aún, la vía de IFN puede activar la homodimerización de STAT-3, induciendo genes con sitios de unión específicos para este factor (SBEs) (González-Navajas *et al.*, 2012). La consecuencia final depende del tipo celular afectado, con fenotipos muy distintos a los inducidos por STAT-1 (Stephanou *et al.*, 2000). De este modo, dependiendo de la disponibilidad de factores intracelulares, se producirán diferentes respuestas celulares mediadas por los IFNs tipo I.

Las vías de desensibilización de los IFNAR1 y 2 involucran diferentes mecanismos que se los suele diferenciar dependiendo el estadio: temprano o tardío (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014). De esta forma, factores como los SOCS1 y 3 y PIAS logran inhibir las señales intracelulares en una etapa temprana. Mientras que se considera que, a largo plazo, USP18 media la desensibilización mediante la inhibición de la interacción del ISG15 con factores de la cascada de señalización intracelular (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014). Otro fenómeno de desensibilización es la endocitosis de los receptores luego de mantenerse una señal sostenida de IFNs en el medio (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014).

Entre las funciones de los IFNs tipo I, se destaca la activación de mecanismos en respuesta a infecciones virales con varios factores como ISGs. Algunos de estos, son capaces de bloquear la reproducción de varios virus en diferentes etapas (Viperina, Mx1, TRIM, entre otros), incrementar la presentación antigénica por MHC clase I, y receptores de factores genéticos virales (RLRs, ALRs, cGAS). Estas vías tienen diferentes impactos en las células del sistema inmunes. En las células dendríticas, inducen una mayor expresión del complejo MHC clase II, y moléculas coestimuladoras (CD80/86), receptores de quimoquinas (CCR5/7 y LFA-1). En las células T, sus efectos dependen de la actividad del TCR. Mientras que, en células efectoras recientemente activadas, los IFNs inducen diferenciación y proliferación, en otras condiciones, inducen factores pro-apoptóticos y anti-proliferativos. Estas respuestas se creen debidas a la abundancia relativa de diferentes STAT, siendo STAT-1 ejecutor de un programa pro-apoptótico, y STAT-3, 4 y 5 lo

contrario (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014; McNab *et al.*, 2015). Sin embargo, también se deben considerar la interacción de la vía de IFNs con otras vías de citoquinas y factores proliferativos.

Los IFNs tipo I afectan la respuesta a patógenos y el estado inflamatorio mediante la regulación de la necroptosis (Sarhan *et al.*, 2019). De esta forma, y con mecanismos moleculares aún desconocidos, es sabido que los IFN tipo I inducen la necroptosis mediante la vía dependiente de ZBP1 (Yang *et al.*, 2020), o junto a TNF α , como se observó en células provenientes de pacientes con lupus eritematoso sistémica (Brault *et al.*, 2018; Sarhan *et al.*, 2019). Por otro lado, la piroptosis está también regulada por los IFN tipo I (Kopitar-Jerala, 2017). En particular, la presencia de IFNs tipo I y II, induce varios ISGs que son componentes del inflamasoma: AIM2, NLRP3, ASC y caspasa-1, IL-18, IL-1 β . De esta forma, los IFNs tipo I promueven la piroptosis, pero al mismo tiempo inducen inhibidores de esta vía como las proteínas POP3, y el factor 25-hidroxycolesterol, un potente inhibidor del ensamblado del inflamasoma (Kopitar-Jerala, 2017).

Los IFNs tipo I tienen un rol muy complejo en las respuestas en intestino. Son importantes inductores de respuestas tolerogénicas, pero al mismo tiempo contribuyen a las respuestas proinflamatorias. El rol pro-tolerogénico es probablemente debido a la inducción de IFN tipo I por agonistas TLR9 provenientes del lumen intestinal. En este caso, los IFNs tipo I inducirían la expresión de componentes de la unión estrecha de los enterocitos fortaleciendo la barrera epitelial, y promoverían la diferenciación de células T regulatorias. De hecho, la administración de IFN β ha sido beneficiosa en la generación de Tregs en pacientes con enfermedades autoinmunes, como esclerosis múltiple, o infectados con Hepatitis C (González-Navajas *et al.*, 2012).

Por otro lado, los IFN tipo I son inductores de la polarización hacia respuestas de tipo I, promoviendo un fenotipo proinflamatorio en las células T CD4⁺ o CD8⁺. En estos casos los IFNs potencian el rol de IL-12p40 para fosforilar y activar al STAT-4, molécula determinante en la expresión de T-bet. Dado que la fosforilación de STAT-4 por la vía de los IFNs tipo I es un efecto únicamente transitorio en ausencia de IL-12p40, los IFN tipo I no son capaces de inducir el perfil Th1 por sí solos, pero sí pueden potenciar la respuesta Th1 inducida por IL12p40, IL-18, y en menor medida, IL-21 (Rogge *et al.*, 1998; Strengell *et al.*, 2002; Berenson *et al.*, 2006). Por otro lado, los IFNs tipo I inhiben la capacidad de las células dendríticas para polarizar la respuesta a perfiles Th2, y son capaces de inhibir la expresión de GATA-3 en linfocitos T de tipo Th2 mediante la acción directa sobre el IFNAR1/2 (Rogge *et al.*, 1998; Berenson *et al.*, 2006).

5.2.2 Interferones tipo III

La familia de interferones tipo III, fue descubierta a principios de la década del 2000 (Kotenko *et al.*, 2003). Está conformada por IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), IFN- λ 3 (IL-28B), IFN- λ 4 (pseudogen en varias poblaciones humanas (O'Brien, Prokunina-Olsson and Donnelly, 2014)). Esta familia se encuentra incluida en la de clase II de citoquinas, junto a la familia de IL-10 y los IFNs tipo I. En sus inicios se consideró a estos IFNs como un sistema redundante con los IFNs tipo I. Sin embargo, hoy se conoce que cumplen diferentes roles y especialmente en las mucosas (Pott *et al.*, 2011; Pott and Stockinger, 2017).

La inducción de los IFNs tipo III es muy similar a la de los IFN tipo I, aunque, para los primeros, el nivel de señal que requieren de las vías de NF-kB e IRF-3 y -7 es mayor

(Schneider, Chevillotte and Rice, 2014; Pott and Stockinger, 2017). Además, se ha propuesto que la expresión de IFN λ 1 puede ser activada por IRF1, mientras que los IFN λ 2 y 3 dependen exclusivamente del IRF3/7 (Odendall *et al.*, 2014; Lazear, Schoggins and Diamond, 2019). Además, las células epiteliales son las mayores productoras de IFNs tipo III durante infecciones entéricas. No obstante, en ciertas situaciones, las células dendríticas plasmocitoides, las células dendríticas clásicas y linfocitos T pueden producirlos (Lazear, Nice and Diamond, 2015; Pott and Stockinger, 2017). En los enterocitos, su producción está asociada a la actividad del MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein) asociado a peroxisomas. De modo que, en la membrana de esta organela la proteína MAVS detecta fragmentos de material genético libre (ARN por RIG-I o ADN por RNA-pol III) e induce la activación de las vías IRF-1, IRF3/7 y NF-kB que generan la producción de IFNs tipo III (Odendall *et al.*, 2014).

Los receptores de los IFNs tipo III, diferentes de los IFNAR-1 y 2, están compuestos por dos cadenas, una de ellas común a la familia de los receptores de IL-10 (IL-10RB o IL-10R2) y otra específica de los IFNs tipo III (IFNLR1) (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014). La expresión diferencial de este receptor es relevante para comprender las diferencias funcionales entre IFNs tipo III y I. Mientras que el IFNAR1/2 está presente en la mayoría de las células, el IFNLR1/IL10RB se expresa principalmente y de forma constitutiva por enterocitos, y puede ser inducido en células del sistema inmune, en especial células presentes en las mucosas (Lazear, Nice and Diamond, 2015). Al igual que IFNAR1y2, los IFNLR1/IL10RB se dimerizan al unirse a sus ligandos, iniciando una cascada de fosforilaciones ejecutada por quinasas JAK1, JAK2 y TYK2 (Lazear, Nice and Diamond, 2015). Este evento inicia una serie de señales intracelulares llevadas a cabo por las proteínas STAT fosforiladas, evento que es análogo al descrito para los IFNs tipo I, con la conformación del complejo ISGF3, y la inducción de diversos ISGs. Sin embargo, existen diferencias entre las vías, siendo los IFN tipo I, potentes inductores de la mayoría de los factores inhibitorios de la vía de señalización (ej. USP18, SOCS-1 y -3) (François-Newton *et al.*, 2011; Stanifer, Pervolaraki and Boulant, 2019). Algunas evidencias experimentales sugieren que los IFNs tipo III podrían tener un efecto de mayor duración en el tiempo, aunque requerirían una mayor concentración local, al menos para células inmunes donde el receptor es menos expresado (Maher *et al.*, 2008). Es posible que las células epiteliales sean más sensibles a los IFNs tipo III que a los IFNs tipo I (Pott *et al.*, 2011).

Los IFNs tipo III cumplen un rol importante en la respuesta antiviral, siendo fundamentales en las barreras epiteliales, donde sus receptores se expresan abundantemente (Pott *et al.*, 2011; Pott and Stockinger, 2017). Además, son fuertes inductores de los componentes de las uniones estrechas en epitelio y endotelio, fortaleciendo la barrera epitelial y endotelial (Lazear, Nice and Diamond, 2015). También es conocido su rol en la modulación de la respuesta inmune mediante su acción directa sobre las células dendríticas, donde pueden modular la generación de una respuesta tipo I (Lazear, Nice and Diamond, 2015). En especial, se ha comprobado que en PBMCs estimulados con IFNs tipo III, reducen la expresión de citoquinas Th2, y aumentan la expresión de IFN γ (Jordan *et al.*, 2007; Srinivas *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2009). En formulaciones vacunales, se observó la inducción de los IFN tipo III contribuye a la respuesta Th1, mientras que animales *Ifnlr1*-KO reducen la polarización a Th1, e incrementan la respuesta Th2 (Morrow *et al.*, 2009). Además, la utilización de IFN λ 3 como adyuvante vacunal incrementó la respuesta T CD8⁺, disminuyendo la respuesta regulatoria (Morrow *et al.*, 2009). En conjunto, estas evidencias indican un rol pro-Th1 de los IFNs tipo III.

Por otro lado, existen otras dos poblaciones celulares que pueden ser moduladas por los IFNs tipo III, los neutrófilos y las células NK. En los primeros, los IFNs tipo III inhiben la respuesta del estallido respiratorio, como un mecanismo de protección al epitelial durante infecciones bacterianas donde se puede generar excesivo estrés oxidativo (Zanoni, Granucci and Broggi, 2017). Por otro lado, se ha sugerido que las células NK requieren IFNLR1 para la óptima secreción de IFN γ (Souza-Fonseca-Guimaraes *et al.*, 2015). A pesar de ello, son escasas las investigaciones que estudian el rol no redundante de los IFNs tipo III.

5.2.3 Biomarcadores de actividad de los IFNs tipo I

Debido a que existen diferentes tipos de IFNs tipo I, la evaluación su actividad es usualmente realizada por la medición de ciertos biomarcadores de la vía. La **Tabla 15**, muestra diferentes tipos de biomarcadores de la vía de IFNs tipo I.

Enfermedad	Tipo de Muestra	Mejores Genes Marcadores	Comentarios	Referencias
Esclerosis Múltiple	PBMCs, Post inyección con IFN β	<i>MX1</i>	Se probaron más de 8500 genes en este trabajo. Los marcadores mantuvieron una inducción entre 9-12hs post inyección con IFN β en pacientes con anticuerpos nucleares positivos.	(Sellebjerg <i>et al.</i> , 2009)
		<i>CCL2</i>		
		<i>CXCL10</i>		
		<i>IFI27</i>		
Esclerosis Múltiple	PBMCs, Post incubación <i>in vitro</i> con IFN β o IFN γ	<i>MX1</i>	USP18 y HERC5 son inducible a bajas dosis de IFN β y son ligeramente más específicos que MX1 en relación con IFN γ .	(Malhotra <i>et al.</i> , 2011)
		<i>HERC5</i>		
		<i>USP18</i>		
Síndrome de Sjögren	Monocitos CD14 ⁺ de sangre periférica	<i>IFI441</i>	Se encontró una correlación entre los niveles de ARNm de MX1 y la proteína en suero. Al mismo tiempo, estos noveles fueron sensibles a diferentes estadios de la enfermedad.	(Maria <i>et al.</i> , 2014)
		<i>IFI44L</i>		
		<i>IFIT3</i>		
		<i>LY6E</i>		
		<i>MX1</i>		

Tabla 15- Diferentes transcritos utilizados como biomarcadores de la actividad de los IFNs tipo I.

Es claro que los genes MX1 o MX2 y USP18 son marcadores de la respuesta a los IFN tipo I, y potencialmente lo son a los IFN tipo III. Lo interesante es que estos marcadores tienen buena selectividad para detectar las señales de IFN tipo I de aquellas inducidas por los IFN de tipo II (Malhotra *et al.*, 2011).

5.2.4 Interferones tipo II

La familia de los IFNs tipo II está compuesta por un único ligando, el IFN γ , que también forma parte de la clase II de citoquinas. El IFN γ tiene varias diferencias con los IFN tipo I, en primer lugar, las células productoras son principalmente células T CD4⁺ Th1, células

T CD8⁺ (Tc1), ILC1 y células NK (Schroder *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2013; Paolini *et al.*, 2015). Esta diferencia deriva del uso de diferentes factores de transcripción, como lo son el NFAT, AP-1 (Schroder *et al.*, 2004), STAT-4 fosforilado (Lawless *et al.*, 2000), modificaciones epigenéticas específicas, y mecanismos regulados por variedad de ARNnc, por ejemplo, el Lnc-13 (Castellanos-Rubio *et al.*, 2016).

El receptor de IFN γ está conformado por dos cadenas IFNGR1 y 2 (Schroder *et al.*, 2004). Cuando se une IFN γ , las cadenas del receptor activan las quinasas asociadas, JAK1 y JAK2, las que fosforilan diversas proteínas intracelulares, en particular STAT-1, lo que induce su posterior homodimerización (Schroder *et al.*, 2004). Este dímero es capaz de migrar al núcleo donde se une a los sitios inducidos por IFN γ (GAS) modulando la expresión de diferentes genes (Schroder *et al.*, 2004). Dado que los IFNs tipo I también logran inducir estos dímeros de STAT-1, se entiende por qué una gran cantidad de señales que son moduladas por IFNs tipo I, también son potencialmente moduladas por IFNs tipo II. A su vez, el IFN γ también puede inducir la formación del ISGF3 activando sitios ISRE (Schroder *et al.*, 2004). Sin embargo, existen genes expresados preferencialmente por cada uno de estos dos tipos de IFNs (Der *et al.*, 1998; He *et al.*, 2010). Un ejemplo es IRF-1 inducido más intensamente por IFN γ que por IFNs tipo I (Der *et al.*, 1998; Schroder *et al.*, 2004; Egwuagu *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, IRF-1 es capaz de unirse al ADN en sitios que presentan un solapamiento de secuencia con ISGF3, por ello es difícil adjudicar una señal distintiva a estas dos familias de IFNs (Darnell, Kerr and Stark, 1994). Aun así, es posible encontrar una respuesta célula-específica diferencial entre ambos tipos de IFNs. Estas diferencias dependen de la densidad de expresión de los receptores de cada tipo de IFN, la abundancia relativa de los STAT (1-6), y modificaciones postraduccionales de los mismos. Al mismo tiempo, se ha confirmado que la señalización por IFN γ requiere una concentración subumbral de IFNs tipo I (Takaoka *et al.*, 2000; Gough *et al.*, 2010). Esto último, resalta la interconexión entre las señales inducidas por los diferentes IFNs.

El receptor de IFN γ tiene una regulación análoga a la descrita para el IFNAR1 y 2, siendo controlado su nivel de expresión en membrana, degradado y reincorporado a la membrana posterior a su unión con el IFN γ (Schroder *et al.*, 2004). También existe una regulación a nivel genético, como se observa en la regulación negativa por IFN γ en las células T CD4⁺ Th2, donde el receptor presenta una expresión alta, mientras es baja los Th1. Este fenómeno explica porque las células Th2 son más sensibles a ser inhibidas por IFN γ que las Th1 (Bernabei *et al.*, 2001). Las proteínas SOCS-1 y-3 también pueden modular mediante la inhibición de la fosforilación de las JAKs, imponiendo un umbral de activación mayor para el receptor (Alexander *et al.*, 1999; Tau and Rothman, 1999). Por último, se ha descrito que las proteínas PTP, como las SHP1 y -2, median la desfosforilación de las JAKs y de factores STATs activados (Abram and Lowell, 2017).

El IFN γ tiene múltiples roles en la defensa contra infecciones virales y bacterianas, aunque solo resumiremos las más directamente relacionadas con la enteropatía:

- *Estimulación de la presentación de antígenos:*
 - Aumento del procesamiento de antígenos y presentación de péptidos por MHC tipo I, e inducción de componentes del “inmuno-proteasoma” (Schroder *et al.*, 2004).
 - Aumento de presentación de antígenos por MHC tipo II en células presentadoras de antígenos profesionales: Células B, Dendríticas, Monocitos y Macrófagos tisulares (Schroder *et al.*, 2004).

- Aumento de moléculas co-estimuladoras en células presentadoras de antígenos profesionales: CD80/86, CD40 (Schroder *et al.*, 2004).
- Inducción de presentación de antígenos por MHC tipo II en células presentadoras no profesionales (enterocitos de intestino delgado, células plasmáticas) (Fais *et al.*, 1992; Yi *et al.*, 1997).
- *Inducción local de quimoquinas* (CXCL10, CXCL11, MIP-1 α /1 β , RANTES, MCP-1) en células endoteliales, epiteliales, plasmáticas (Schroder *et al.*, 2004).
- *Inducción de agentes antimicrobianos oxidativos ROS/RNS* (Coccia *et al.*, 2000; Hodny *et al.*, 2015).
- *Influencia en el fenotipo celular de leucocitos:*
 - Inducción de fenotipo citotóxico de células NK y linfocitos T citotóxicos en lamina propria y LIEs (Bhat *et al.*, 2017).
 - Polarización de Macrófagos a fenotipo M1 (Wang *et al.*, 2018).
- *Aumento de la permeabilidad vascular y epitelial:* inducción de VE-cadherina (Langer *et al.*, 2019), ICAM-1 (Jahnke and Johnson, 1995). Disminución de proteínas fundamentales para mantener las uniones estrechas como ZO-1 (Youakim and Ahdieh, 1999), E-cadherina (Smyth *et al.*, 2012), JAM-A (Ozaki *et al.*, 1999), reducción de la expresión de claudina-1 y -2, y ocludinas (Bruewer *et al.*, 2005; Willemsen *et al.*, 2005).
- *Modificación de la matriz extracelular:*
 - Inducción de Transglutaminasa 2 (Bayardo *et al.*, 2012).
 - Inducción de metaloproteasas específicas por macrófagos y fibroblastos (Martelli-Junior *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2012).

El IFN γ es un fuerte modulador en la respuesta tanto innata como adaptativa. Es capaz de inhibir la respuesta Th2 actuando directamente sobre células T de perfil Th2 (Gajewski and Fitch, 1988) o sobre las células ILC-2 (Molofsky *et al.*, 2015; Kudo *et al.*, 2016). En ambos casos IFN γ inhibe la producción de citoquinas características (ej: IL-13, IL-5), y también afecta negativamente su proliferación y la respuesta a estímulos. Por otro lado, el IFN γ tendría un rol adyuvante en la respuesta regulatoria, en parte mediante la inducción de la enzimaIDO en células dendríticas, que tiene una función supresora sobre las células T efectoras (Wood and Sawitzki, 2006). Aunque en respuestas crónicas, IFN γ induce la producción de componentes inhibitorios de las Treg al actuar sobre los macrófagos M1 que inhiben la actividad de laIDO mediante la producción de NO por la enzima iNOS (Wood and Sawitzki, 2006). Por otra parte, el IFN γ es capaz de estimular la producción de los IFNs tipo I, que pueden inducir citoquinas como IL-15 en células dendríticas (Mattei *et al.*, 2001), la que finalmente tiene actividad inhibitoria de las Treg (Zanzi *et al.*, 2011). Es así, que el balance en la producción de IFN γ puede afectar la actividad de las células Tregs de forma positiva o negativa en diferentes modelos y situaciones patológicas.

El IFN γ también modula la proliferación y muerte celular de diferentes células. Es capaz de inducir un arresto del ciclo celular en fase G1/S o G0 en células como los macrófagos (Sangfelt and Strander, 2001; Kotredes and Gamero, 2013). Este efecto podría ser beneficioso para disminuir la replicación de ciertos virus. También es capaz de inducir apoptosis y sensibilizar células para ejecutar programas de muerte proinflamatoria como lo son la ferroptosis, necroptosis y piroptosis (Kopitar-Jerala, 2017; Wang *et al.*, 2019; Cornut, Bourdonnay and Henry, 2020; Yang *et al.*, 2020). A nivel de la mucosa intestinal

estos mecanismos son muy relevantes ya que determinan la progresión de la respuesta inflamatoria. De esta forma, la muerte por procesos apoptóticos induce un perfil pro-regulatorio de las células dendríticas y macrófagos, mientras que la muerte proinflamatoria lleva a efectos opuestos.

Podemos mencionar los siguientes roles del IFN γ en la muerte celular programada.

- Efecto pro-apoptótico:
 - Inducción de CD95L (FasL)(Fluhr *et al.*, 2007).
 - Inducción de HLA-E (Gustafson and Ginder, 1996).
 - Inducción de BAK y represión de BCL-2 que promueven la apoptosis intrínseca (Zhou *et al.*, 2008).
- Efecto pro-necroptosis:
 - Inducción de la expresión de la MLKL e inducción de necroptosis vía ZBP1 (Sarhan *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020).
- Efecto pro-piroptosis:
 - Por medio de IRF-1 induce la expresión de AIM2 e IFI16 en diversas células (Finethy *et al.*, 2015; Strittmatter *et al.*, 2016).
 - Inducción de diferentes miembros de la familia GBPs (Guanylate binding proteins), los cuales son fundamentales para la activación de diversos tipos de inflamomas (Finethy *et al.*, 2015).
 - Inducción de la expresión de NLRP3 (Kopitar-Jerala, 2017) y Caspasa-11 en ratones (Caspasa 4/5 en humanos) (Meunier *et al.*, 2014; Cornut, Bourdonnay and Henry, 2020).
- Efecto pro-ferroptosis:
 - Por medio de la inhibición de la expresión de SLC3A2, SLC7A11 (Wang *et al.*, 2019).

Todo esto señala la capacidad de los IFNs como moléculas capaces de aumentar la sensibilidad, y en algunos casos, disparar mecanismos de muerte celular tanto inflamatorios (ferroptosis, necroptosis y piroptosis) como no inflamatorios (apoptosis). De esta forma, el balance entre ambos procesos y la velocidad de proliferación y reemplazo de las células dañadas o eliminadas determinará un nuevo estado tisular en condiciones inflamatorias crónicas. Es, en este escenario, donde la liberación de citoquinas y alarminas por mecanismos de muerte celular pro-inflamatoria conducen al establecimiento y progresión del estado inflamatorio.

5.2.5 IRFs (Factores Reguladores de IFNs)

La familia de moléculas “IRF” son factores fundamentales en la inducción y respuesta a los interferones. Esta familia está compuesta por diversos miembros: IRF (1-9) y factores relacionados (ej: vIRF) (Taniguchi *et al.*, 2001). Aunque se debe aclarar que no todos los factores están asociados con la vía de los IFNs, por ejemplo, el IRF4 no forma parte de la señalización de estos, pero si es regulado por ligandos TLRs. Sin embargo, los miembros IRF1, 2, 3, 5, 7 y 9 influyen directamente la inducción y respuesta a los IFN tipo I y Tipo III, y en menor medida, a la tipo II (Honda and Taniguchi, 2006; Jefferies, 2019). El nivel relativo de dichos factores en cada tipo celular es uno de los mecanismos que regulan la inducción y la respuesta a los IFNs. De esta forma, se sabe que IRF3 es un factor constitutivo en varias células mieloides, mientras que IRF7 es principalmente inducido mediante la vía de IFNs tipo I y en menor medida por los IFN tipo II (Jefferies,

2019). Es por ello, que una señal basal sostenida en el tiempo de IFNs permite mantener un nivel alto de expresión de ambos factores, lo cual, se asocia a una respuesta más intensa a los IFNs.

Los IRFs tienen distintas actividades en la inducción de IFNs. Los IRF7 y IRF3 median la activación de señales u sensores intracelulares como TBK-1 (activado por vía cGAS-STING, TLR3/4 y MDA5/RIG-I-MAVS) (Jefferies, 2019). Por otro lado, existen varios IRFs que son capaces de regular procesos de maduración y plasticidad del fenotipo celular (Jefferies, 2019). El caso de los factores IRF1, 2, 5 y 8, son fundamentales a nivel intestinal, para el desarrollo de la mayor parte de las células del sistema inmune (Jefferies, 2019). Para el caso de IRF-8, se ha demostrado la importancia en el desarrollo y proliferación de células como monocitos, células dendríticas, macrófagos, microglia, mastocitos, entre otros (Luda *et al.*, 2016; Jefferies, 2019). Además, se comprobó que IRF-8 es un factor que, junto con la proteína PU.1, mantiene las características funcionales de los macrófagos (Langlais, Barreiro and Gros, 2016). Al mismo tiempo IRF-8, resulta crucial en la respuesta de las células dendríticas a los IFNs tipo I (Tailor *et al.*, 2007) y tiene actividades adyuvantes en la respuesta de IFNs tipo II (Langlais, Barreiro and Gros, 2016). Por otro lado, IRF-1 e IRF-8 forman una estructura regulatoria, denominada “reguloma IRF8/IRF1”, inducida por IFNs tipo II que es fundamental en la respuesta de macrófagos al IFN γ . Particularmente, el reguloma es capaz de inducir la expresión de genes como: CIITA, IL7R, IL17RA/B, IL21R, IL12RB1, TLR3, producción de factores del complemento, CARD11, y moléculas coestimuladoras (Langlais, Barreiro and Gros, 2016). La importancia clínica del “reguloma IRF8/IRF1” se ha descrito en diversas enfermedades inflamatorias como: Artritis Reumatoide (Okada *et al.*, 2014), Lupus eritematoso sistémico (Graham *et al.*, 2011), Esclerosis Múltiple (Beecham *et al.*, 2013).

Asimismo, el factor IRF-1 es imprescindible en el desarrollo de linfocitos como células NK, células T CD8⁺ circulantes y en la capacidad de producción citoquinas (IL-15, IL-12) que inducen el fenotipo Th1 durante la presentación antigénica (Jefferies, 2019). Este factor es crítico en la respuesta a agentes infecciosos en células epiteliales y endoteliales de la mucosa intestinal y respiratoria (Panda *et al.*, 2019). Estas funciones se deben a que IRF-1 mantiene un nivel transcripcional basal de las proteínas que conforman al sistema de detección de estos patógenos (MAVS, STING, ALRs, RLRs, entre otros). Es así como el factor IRF-1 es elemental para la expresión de IFN tipo III en el epitelio (Odendall *et al.*, 2014). También es conocido el rol de IRF-1 en inducir factores asociados a vías de muerte como la piroptosis, siendo un inductor de Caspasa-1, -4 y -5 (Cornut, Bourdonnay and Henry, 2020), y de la necroptosis (MLKL) (Knuth *et al.*, 2019) y el factor ZBP1 (Kuriakose and Kanneganti, 2018; Yang *et al.*, 2020). Dado que IRF-1 es inducido por la propia respuesta a los IFNs (Novatt *et al.*, 2016), en particular IFNs tipo II (Flodström and Eizirik, 1997), la señal de IFNs genera un circuito de retroalimentación positiva en la propia vía.

5.2.6 Estudios previos de IFNs en la enfermedad celíaca

En la introducción general hemos mencionado las características que vinculan a los IFNs tipo I y tipo II con la EC. En esta sección se destacan los más relevantes y, en especial, se describen potenciales relación entre los IFNs tipo III y EC, considerando que no existen al momento publicaciones específicas.

Tipo de IFN	Características relevantes relacionadas con este trabajo	Referencias
IFN tipo I	Pacientes con infecciones virales Hepáticas tratados con IFN tipo I, desarrollan enfermedad celíaca	(Adinolfi, Mangoni and Andreana, 2001)
	Se asocia un aumento de producción de IFN α en células dendríticas derivados de pacientes celíacos activos	(Di Sabatino <i>et al.</i> , 2007)
	El estímulo de biopsias de pacientes ACD con IFN tipo I, induce expresión de IFN γ , al mismo tiempo, el bloqueo de los IFN tipo I en biopsias estimuladas con PT-Gliadinas reduce la producción de IFN γ .	(Monteleone <i>et al.</i> , 2001; Jarry <i>et al.</i> , 2017)
	Inducción de respuestas Th1 por medio de inducción de IL-18 en biopsias de pacientes ACD estimuladas con IFN tipo I	(Jarry <i>et al.</i> , 2017)
	Inducción de apoptosis de células epiteliales de biopsias de pacientes ACD en respuesta a IFNs tipo I	(Jarry <i>et al.</i> , 2017)
IFN tipo II	Evidencia de producción de IFN γ en células T de biopsias de pacientes ACD estimuladas con PT-Gliadinas	(Nilsen <i>et al.</i> , 1995, 1998)Nilsen 1995
	Aumento de IFN γ en biopsias de pacientes ACD incubadas con PT-Gliadinas	(Nilsen <i>et al.</i> , 1995, 1998)Nilsen 1995
	El nivel de ARNm de IFN γ correlaciona con el grado de severidad de la enteropatía	(Wapenaar <i>et al.</i> , 2004)
	Aumento de TG2 en biopsias de pacientes ACD dependiente de IFN γ	(Jin <i>et al.</i> , 2011; Bayardo <i>et al.</i> , 2012)
	Inducción de genes pro-apoptóticos (aumento de BAK y disminución de BCL-2) en células epiteliales en pacientes ACD post-incubación con IFN γ	(Cheravsky <i>et al.</i> , 2002)
	Compromiso de la barrera epitelial es dependiente de células Th1 IFN γ ⁺ .	(Bethune <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 16-Asociaciones entre IFNs Tipo I y II con la Enfermedad Celíaca

En la

Tipo de IFN	Características relevantes relacionadas con este trabajo	Referencias
IFN tipo I	Pacientes con infecciones virales Hepáticas tratados con IFN tipo I, desarrollan enfermedad celíaca	(Adinolfi, Mangoni and Andreana, 2001)
	Se asocia un aumento de producción de IFN α en células dendríticas derivados de pacientes celíacos activos	(Di Sabatino <i>et al.</i> , 2007)
	El estímulo de biopsias de pacientes ACD con IFN tipo I, induce expresión de IFN γ , al mismo tiempo, el bloqueo de los IFN tipo I en biopsias estimuladas con PT-Gliadinas reduce la producción de IFN γ .	(Monteleone <i>et al.</i> , 2001; Jarry <i>et al.</i> , 2017)
	Inducción de respuestas Th1 por medio de inducción de IL-18 en biopsias de pacientes ACD estimuladas con IFN tipo I	(Jarry <i>et al.</i> , 2017)
	Inducción de apoptosis de células epiteliales de biopsias de pacientes ACD en respuesta a IFNs tipo I	(Jarry <i>et al.</i> , 2017)
IFN tipo II	Evidencia de producción de IFN γ en células T de biopsias de pacientes ACD estimuladas con PT-Gliadinas	(Nilsen <i>et al.</i> , 1995, 1998)Nilsen 1995
	Aumento de IFN γ en biopsias de pacientes ACD incubadas con PT-Gliadinas	(Nilsen <i>et al.</i> , 1995, 1998)Nilsen 1995
	El nivel de ARNm de IFN γ correlaciona con el grado de severidad de la enteropatía	(Wapenaar <i>et al.</i> , 2004)
	Aumento de TG2 en biopsias de pacientes ACD dependiente de IFN γ	(Jin <i>et al.</i> , 2011; Bayardo <i>et al.</i> , 2012)
	Inducción de genes pro-apoptóticos (aumento de BAK y disminución de BCL-2) en células epiteliales en pacientes ACD post-incubación con IFN γ	(Cheravsky <i>et al.</i> , 2002)
	Compromiso de la barrera epitelial es dependiente de células Th1 IFN γ ⁺ .	(Bethune <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 16, se mencionan las más contribuciones más relevantes de los IFNs Tipo I y II en la patogenia de EC (Jabri and Sollid, 2006; Abadie *et al.*, 2011; Mazzarella, 2015). A pesar de las evidencias experimentales quedan interrogantes a resolver: ¿Todos los pacientes celíacos presentan una respuesta Th1? ¿Existen otros tipos de respuestas inmunes, como Th17, Th2 que jueguen algún rol en la enfermedad? Existen subgrupos de pacientes celíacos con respuestas inmunes diferentes al gluten.

5.3 Eje de citoquinas IL-21/IL-17a

Las citoquinas IL-21 e IL-17a son secretadas por células T ($CD4^+$ o $CD8^+$), T folicular helper (Tfh) y NKT (Gaffen *et al.*, 2014; Leonard and Wan, 2016). La IL-21 es producida por un amplio conjunto de células T. Por ejemplo, las células T Th1 son capaces de secretar IL-21 en conjunto con $IFN\gamma$, así como también linfocitos Th1/17 (Wei *et al.*, 2007; Hirota *et al.*, 2011) y Tfh (Liu and King, 2013). Por otro lado, IL-17a es producido por un gran número de células diferentes, no solo células T, sino también las células ILC-3 (Zeng *et al.*, 2019), mastocitos (Noordenbos *et al.*, 2016; Frossi *et al.*, 2017) y células B/plasmáticas (Vazquez-Tello *et al.*, 2012; Bermejo *et al.*, 2013).

5.3.1 Biología de la citoquina IL-21

La IL-21, es una citoquina de clase I, junto con IL-2, -4, -7, -9, e -15. Señaliza mediante un receptor de superficie conformado por dos cadenas transmembrana, una cadena común con las otras citoquinas de la clase I, llamada cadena γ_c , y otra específica, IL-21R. Esta cadena se expresa en células inmunes (células T, células B, células plasmáticas, macrófagos, monocitos y células dendríticas) y células no inmunes (enterocitos y células endoteliales) (Leonard and Wan, 2016).

Una vez que la IL-21 interactúa con el receptor en membrana, se produce la activación de diferentes vías intracelulares, como: STATs, MAPK, PI3K (Leonard and Wan, 2016). Dentro de los STATs, la IL-21 activa principalmente a los STAT-1 y la STAT-3. A su vez, la activación de STAT-1 se relacionó con la capacidad de IL-21 de estimular a células T $CD8^+$ y $CD4^+$ de memoria y células NK, y NKT (Leonard and Wan, 2016). Por esta vía, IL-21 induce la expresión del factor T-bet, la producción de $IFN\gamma$ y moléculas de actividad pro-citotóxica (Fröhlich *et al.*, 2009). Además, IL-21 interviene en el control de la actividad metabólica celular aumentando el metabolismo oxidativo. Este proceso condiciona la diferenciación de las células T a célula de memoria (Loschinski *et al.*, 2018). Por otro lado, IL-21 puede inducir apoptosis en las Tregs ($CD4^+$, $CD25^{hi}$, $FoxP3^+$) (Tortola *et al.*, 2019).

La IL-21 potencia la expresión de genes inducidos por $IFN\gamma$ (por ejemplo: Lag3, Granzima A). En diferentes modelos animales, se ha observado que la interacción IL-21- $IFN\gamma$ es relevante en la respuesta efectiva frente a infecciones intestinales (Tortola *et al.*, 2019). Asimismo, esta citoquina tiene un efecto sinérgico con otras citoquinas como IL-15 e IL-18 en la producción de $IFN\gamma$ por medio de la activación de señales STAT-1 y -4 (Strengell *et al.*, 2003). Por lo tanto, se considera que IL-21 tiene un rol relevante en mantener y potenciar las respuestas Th1.

IL-21, mediante el factor STAT-3, promueve la diferenciación de las células B en los centros germinales, induce el cambio de isotipo y la formación de células plasmáticas. Aunque también es capaz de acelerar procesos de apoptosis en las células B no estimuladas por CD40 o el propio BCR. (Ozaki *et al.*, 2004). La vía de STAT-3, en conjunto con señales generadas por $TGF\beta$, estimulan la expansión de las células Th17 (Huber *et al.*, 2008), y puede regular a la vía STAT-1, siendo importante para el control de las células T Th1. En estas células, STAT-3 reduce la polarización a Th1 y promueve la respuesta pro-tolerogénica. De hecho, la vía de STAT-3 inducida por IL-21 mantiene el fenotipo celular de las Tr1 supresoras que expresan citoquinas como IL-10, $IFN\gamma$, IL-5 y $TGF\beta$, y moléculas citotóxicas (Granzima-B). Estas células controlar las respuestas autoinmunes mediante efectos citotóxicos sobre células T auto-reactivas o células

mieloides (Pot *et al.*, 2009). De manera análoga, la IL-21 también estimula la producción de células B regulatorias (Breg), productoras de IL-10 (Lindner *et al.*, 2013).

Por otro lado, IL-21 es capaz de regular la producción de una citoquina relevante en el epitelio intestinal, la IL-22, por estimulación de las ILC3 IL-22⁺ (Poholek *et al.*, 2019), y de células T CD4⁺ AhR⁺ (Yeste *et al.*, 2014). IL-22 es promotora de la proliferación epitelial, estimula la producción de péptidos antimicrobianos (Regγ3, Defensinas) por los enterocitos, y la producción de mucus por células caliciformes (Zhang *et al.*, 2019). De esta forma, IL-22 tiene un rol notable en la respuesta a infecciones intestinales y regula la composición de la microbiota intestinal (Parks *et al.*, 2016).

Existen pocos trabajos que detallan el control de la expresión de IL21 en células T humanas. Se sabe que varias citoquinas, miembros de la clase I, son fuertes inductoras de la producción de esta citoquina. Por ejemplo, las citoquinas IL-2, IL-7, e IL-15 inducen IL-21, pero no IL-4. La IL-21 puede inducirse a sí misma en las células T IL-21⁺ (Caprioli *et al.*, 2008) y también mediante la incubación con IL-6 o IFNs (Strengell, Julkunen and Matikainen, 2004). Por otro lado, el factor STAT-3 induce la expresión de IL-21 mediante la unión de sitios GAS en el promotor del gen IL-21 (Caprioli *et al.*, 2008), aunque también hay otros factores de transcripción, como el NFatc2 en células Th2 y el propio T-bet en células Th1, que pueden inducirla (Mehta *et al.*, 2005). En el caso de pacientes celíacos activos, la propia IL-21 y/o la IL-15 activan su producción en células T por medio de una vía dependiente de Akt (Sarra *et al.*, 2013).

La expresión del receptor de IL-21, IL-21R, depende, entre otros factores, de IFNs tipo I que tiene un efecto inhibitorio (Strengell, Julkunen and Matikainen, 2004), mientras que el TNFα es un factor estimulador (Brenne *et al.*, 2002). En células B, se observó puede ser inducido por ligandos de TLR-9, como CpG ODN (CpG oligodeoxynucleotides), o por activación de moléculas coestimuladoras (Hagn *et al.*, 2014).

5.3.2 Estudios de IL-21 en enteropatía de la enfermedad celíaca

Mediante diferentes estudios se confirmó la asociación entre IL-21 y EC, en especial se observó un incremento del número de células T productoras de IL-21 tanto en la *lamina propria* como en el epitelio de los pacientes celíacos en relación con los controles (Leeuwen *et al.*, 2013; Sarra *et al.*, 2013). La mayoría de las células T productoras de IL-21 de la *lamina propria* expresan el receptor CXCR5, lo que las identifica como células Tfh. Mientras que, en el epitelio, se encontró que los LIEs IL-21⁺ expresaban el TCR γδ (Sarra *et al.*, 2013). En estos casos, IL-21 cumpliría un rol estimulador de células T que, en particular, podría incrementar la función citotóxica de los LIEs sobre los enterocitos. Por otro lado, el mayor número de células Tfh IL-21⁺ en *lamina propria* podría asociarse con la sobrevida y estimulación de las células plasmáticas, que se encuentran aumentadas en duodeno de pacientes celíacos activos. Estas últimas son células importantes en la patogenia de la EC, pues además de su rol como productoras de anticuerpos, también podrían actuar como células presentadoras de antígenos (Sarra *et al.*, 2013; Høydahl *et al.*, 2019).

5.3.3 Biología de la citoquina IL-17A

La IL-17A es miembro de la familia de la IL-17, que es una familia estructuralmente diferente a la de las otras citoquinas, tanto en sus ligandos, como en los dominios característicos de sus receptores celulares (Gaffen *et al.*, 2014). La familia de IL-17, está conformada por 6 miembros, IL-17 A, B, C, D, E, F, siendo IL-17A el más estudiado, e

IL-17F el homólogo funcional y estructural más cercano al IL-17A (Gu, Wu and Li, 2013).

Se ha descrito la participación de IL-17A en condiciones proinflamatorias en modelos animales de encefalomielite autoinmune experimental (EAE) y psoriasis. Su bloqueo tiene efectos terapéuticos en pacientes con psoriasis, Artritis Reumatoide, Asma y Diabetes Mellitus tipo 1 (Gaffen *et al.*, 2014). IL-17A también es importante en generar señales que preservan la integridad de la barrera epitelial intestinal (Gaffen *et al.*, 2014).

Su receptor está formado por dos cadenas, una cadena IL-17RA y otra cadena IL-17RC. Esta última, es de escasa expresión y por ello es la limitante en la respuesta a IL-17A. Sin embargo, este heterodímero también puede unirse con menor afinidad al homodímero de IL17F y a un heterodímero IL17A-F. Otros receptores miembros de la familia de IL17, IL17RA-E, conforman diferentes heterodímeros capaces de unir a otras interleuquinas de esta familia de proteínas (IL17C e IL17E) (Gaffen *et al.*, 2014). El receptor IL17RA/C es expresado por células no inmunes, lo que explica la respuesta a IL-17A o F en células no hematopoyéticas. En particular, el receptor es expresado por células epiteliales intestinales, queratinocitos, fibroblastos, pericitos, células endoteliales, osteocitos, entre otras (Ge and You, 2008). Entre las células hematopoyéticas sensibles a IL-17A se encuentran los neutrófilos, monocitos y ciertas células dendríticas (Ge *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014).

El motivo SEFIR en la cola citoplasmática de los IL-17Rs es único entre los receptores de citoquinas, y le confiere la capacidad de reclutar al factor intracelular ACT1 (también conocido como TRAF3IP2). Este factor media la activación de proteínas TRAF, como el TRAF6, que activa de las vías NF-kB, MAPK y Erk. En la **Tabla 17** se listan algunos de los efectos de IL-17A en la inducción de diferentes genes (Gu, Wu and Li, 2013; Gaffen *et al.*, 2014).

En general, IL-17A ejerce pocos efectos directos, siendo un agente potenciador o sinérgico de la acción de otras citoquinas. Por ejemplo, IL-17A potencia la acción de IL-22 en la producción de péptidos antimicrobianos por enterocitos (Gaffen *et al.*, 2014; Dixon *et al.*, 2016), también promueve la expresión de quimoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento en células epiteliales o fibroblastos inducidas por TNF α (Lee *et al.*, 2008). En este sentido, IL-17A promueve la inducción de diversas quimoquinas, particularmente aquellas que reclutan neutrófilos, células Th17 y ILC3 IL-17⁺ que comúnmente expresan CCR6. Por otro lado, IL-17A estimula diferentes factores de crecimiento y péptidos antimicrobianos, que cumplen un rol importante en reparación de heridas y protección de la barrera epitelial (Gaffen *et al.*, 2014; Eyerich, Dimartino and Cavani, 2017). El mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial se logra por inducción de los componentes de las uniones estrechas, que aumentan la resistencia eléctrica transepitelial y reducen la permeabilidad (Kinugasa *et al.*, 2000).

IL-17A también participa en la remodelación de la matriz extracelular, a través de la inducción de metaloproteasas (MMP) como las MMP-3, -9 secretadas por fibroblastos (Singh *et al.*, 2018; Edwar *et al.*, 2019).

Tipo de Celular	Gen inducido	Referencia
Queratinocito	CCL20.	(Harper <i>et al.</i> , 2010)
Célula Epitelial Intestinal (IEC), estimuladas con IL-22	<i>DEFB1-4</i> (Defensinas), <i>S100A8</i> (Calprotectina), <i>LCN2</i> (Lipocalina-2).	(Dixon <i>et al.</i> , 2016)
Células Epiteliales Bronquiales	<i>CXCL1</i> , <i>CXCL2</i> , <i>CXCL5</i> y <i>CXCL8</i> .	(Luo <i>et al.</i> , 2019)
IEC (HT-29) estimulada con TNF α	<i>CXCL8</i> , <i>CXCL1</i> y <i>CCL20</i> y reprime: <i>CXCL10</i> , <i>CXCL11</i> y <i>CCL5</i> .	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
Fibroblastos Sinoviales	<i>CXCL1</i> , <i>CXCL8</i> , <i>IL-6</i> , <i>CCL20</i> , <i>FGF</i> (Fact. Crecimiento de Fibroblastos), <i>AREG</i> (Anfiregulina), entre otros.	(Hattori <i>et al.</i> , 2015)
IEC (T84)	<i>CLDN1</i> , <i>CLDN2</i>	(Kinugasa <i>et al.</i> , 2000)

Tabla 17- Genes Inducidos por IL-17A en diferentes células no Inmunes.

Las células que liberan IL-17A al ambiente son principalmente: células T (CD4⁺ o CD8⁺), ILC3 (Gaffen *et al.*, 2014) y, en menor proporción, mastocitos (Noordenbos *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2016; Frossi *et al.*, 2017), células B y células plasmáticas (Bermejo *et al.*, 2013). Los factores IRF4 y BATF son fundamentales en la generación de células Th17 (Palone *et al.*, 2018). Mientras que ROR γ t es importante para la inducción de IL-17A y IL-17F (Gaffen *et al.*, 2014). HIF1 α y BLIMP1 son, también, factores de transcripción necesarios para las respuestas de Th17 en células T autorreactivas (Gaffen *et al.*, 2014).

Dependiendo de las señales de diferenciación liberadas por células dendríticas se pueden generar dos tipos de células Th17. En presencia de IL-6 y TGF β , se producen células Th17 eficaces en la eliminación de diferentes infecciones (*S. aureus*, *Candida spp.*, *E. coli*, *M. Tuberculosis*, entre otras), pero sin rol patogénico. Mientras que, si además de IL-6 y TGF β , se encuentran IL-1 β o IL-23, las células Th17 tendrán un perfil inflamatorio más agresivo, y producen IL-17A, IL-22, IL-21, IFN γ y GM-CSF. Estas células se encuentran asociadas a patologías como psoriasis, artritis reumatoide, o modelos de enfermedades autoinmunes como el modelo de EAE. Las diferencias entre estos dos fenotipos están vinculadas a la inducción de diferentes factores de transcripción como HIF1 α y BLIMP1. Por lo tanto, el eje IL-17A/IL-23/IL-1 β tiene un rol patogénico demostrado y se lo considera un prometedor blanco de acción terapéutica en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (Gaffen *et al.*, 2014).

5.3.4 Estudios sobre IL-17A en Enfermedad Celíaca

Se han realizado varios estudios sobre el rol de IL-17A en la patogenia de EC, aunque no se han obtenido resultados coincidentes. En las primeras evaluaciones, se observaron niveles elevados de ARNm del IL17A en biopsias de pacientes celíacos activos. Mientras que, por citometría de flujo, se encontró un aumento de las células TCD4⁺ IL-17A⁺ en lamina propria de la mucosa duodenal de los pacientes ACD. Incluso el tratamiento *ex vivo* de las biopsias duodenales con PT-Gliadinas indujo aumento de IL-17A ARNm (Monteleone *et al.*, 2010). En línea con estas observaciones, se encontró un número

incrementado de células Th17 (IRF4⁺, CD45RO⁺, CCR6⁺, IL23R⁺, CD161⁺) que coexpresan IL-17A, IL-21, IL-22 e IFN γ en duodeno de pacientes ACD (Fernández *et al.*, 2011). Estos estudios mostraron la presencia de una respuesta Th1/Th17 a péptidos de gluten en pacientes celíacos, y que, como se comentó antes, este fenotipo de células Th17 tiene rol patogénico. Sin embargo, otras investigaciones plantearon observaciones contradictorias. Por ejemplo, se observó que en clones de células T aislados de biopsias intestinales de pacientes ACD, la producción de IL-17A estaba inhibida, pero no así la producción de IL-21, ni de IFN γ (Bodd *et al.*, 2010). En otros estudios, tampoco se encontró un aumento significativo en el número total de células Th17 en duodeno o sangre periférica de pacientes ACD, incluso existía una disminución en el número de células T IL-17A⁺ en el epitelio de los pacientes ACD y a su vez, se demostró que el número de células Th17 dependía de la edad del paciente, aumentando con la misma (Scaleia *et al.*, 2012). Finalmente, en otros estudios no se encontró un aumento del número total de las células IL-17A⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes ACD, pero sí de las células IL-21⁺. Sin embargo, los pacientes con un mayor grado de enteropatía presentaron un mayor número de células IL-17A⁺ en duodeno (Leeuwen *et al.*, 2013).

En este tipo de evaluaciones debe tenerse en cuenta que el uso de diferentes metodologías puede arrojar resultados diferentes. Por ejemplo, para la evaluación por citometría de flujo, se requiere disgregación mecánica y enzimática del tejido, lo cual afecta la viabilidad de las células, y en algunos casos, los epitopes de los marcadores de interés. En cambio, el recuento del total de células IL-17A⁺ por inmunofluorescencia, puede incluir células T, ILC3, mastocitos y potencialmente células B/plasmáticas. A su vez, existe una enorme variabilidad individual en la población celíaca, ciertas variables no estudiadas como: la microbiota, dieta y carga genética, influyen en la polarización de las células T, ejerciendo diferencias en las cohortes de pacientes estudiados.

Aún con cierta disparidad en las observaciones, se considera que los pacientes celíacos pueden presentar respuestas de células Th17/Th1, particularmente asociados a una condición inflamatoria crónica severa (IFN γ elevado y/o enteropatía severa).

5.4 HIF1 α y VEGFA

HIF1 α es un factor de transcripción asociado al estrés celular, principalmente estrés por hipoxia y también estrés inflamatorio (Rius *et al.*, 2008). A su vez, ha sido asociado a la EC, debido a su inducción en pacientes ACD (Vannay *et al.*, 2010). Por otro lado, en los últimos años diferentes publicaciones han vinculado a este factor con ciertos roles en la respuesta celular a los IFNs. De esta forma, HIF1 α es importante mediador de ciertas funciones proinflamatorias ejercidas por macrófagos expuestos a IFN γ , o también en la pérdida de permeabilidad epitelial ocasionada por este mismo factor (Yang *et al.*, 2014; Braverman *et al.*, 2016; Watts and Walmsley, 2019). Además, se ha relacionada a HIF1 α con la capacidad de los IFNs de inducir muerte necrótica regulada por necroptosis en ciertos macrófagos (Karshovska *et al.*, 2019). Por otro lado, VEGFA es un factor asociado recientemente con la EC, el cual es controlado por HIF1 α (Forsythe *et al.*, 1996; Dengler, Galbraith and Espinosa, 2014; Rezaei-Tavirani, Rostami-Nejad and Montazar, 2019). A su vez, tanto HIF1 α , como VEGFA han sido vinculados con la respuesta tipo 3 siendo fundamentales en el perfil pro-Th17 en células T CD4⁺ y T CD8⁺ (Gaffen *et al.*, 2014; Palazon *et al.*, 2017).

Por lo antes comentado, es interesante planearse si estos factores se pueden asociar con las vías de IFNs y/o la vía de respuesta Th17 en los pacientes celíacos.

5.5 Justificación sobre la evaluación de mediadores inflamatorios en la enfermedad celíaca

Como se desarrolló en este capítulo, la evaluación de diferentes mediadores inflamatorios permite realizar correlaciones y asociaciones entre los factores que pueden estar implicados en la patogenia de la EC. Este tipo de aproximaciones tiene la capacidad de sugerir potenciales interacciones entre los factores medidos y signos característicos de la enfermedad, como el grado de enteropatía, la respuesta humoral y celular. En especial, la evaluación de estos mediadores permitiría sub-agrupar determinadas vías asociadas con la familia de los IFNs y las citoquinas del eje IL17/IL21, que puedan estar asociadas a la enfermedad. Dado que se observa alta variabilidad individual, el fin último de este análisis es evaluar si existen subgrupos de pacientes y de ser así si se puede lograr una interpretación mecanística de esa diferencia, y si eso condiciona el desarrollo de la patología.

De esta forma, la evaluación de la expresión de los genes *IFNB1*, *IFNG*, *IFNL1*, *IFNL2/3*, *IL10*, *IL22*, *IL23A*, *IL17A*, *IL21*, entre los pacientes celíacos activos y los controles no celíacos, nos permitirá tener un visión general sobre posibles asociaciones en la patología. Además, sumamos a este análisis la evaluación de factores biomarcadores por estas señales como los genes: *MX1*, *IRF8*, *IRF1*, *VEGFA*, *HIF1A*, *SOCS1*, *SOCS3*, y de esta forma poder hacer un análisis extensivo de las señales involucradas.

Por otro lado, también es nuestro interés realizar un análisis del nivel de expresión de las citoquinas IL-21 e IL-17A en la mucosa de los pacientes celíacos. Dadas las contradicciones presentadas en la bibliografía, es nuestro interés evaluar la población local. En este caso, no solo realizaremos un estudio de los marcadores asociados al eje Th17 (*IL17A*, *IL21*, *IL22*, *IL23A*) a nivel de ARNm, sino también un análisis por técnicas de inmunofluorescencia en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos.

5.6 Objetivos específicos de la parte B

- Evaluar la expresión y actividad de los tres tipos de IFNs en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos y muestras de población control.
- Analizar la expresión de las citoquinas del eje Th17 (IL-17A, IL-21, IL-22 e IL-23A) y las células que las expresan IL-17A e IL-21 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos y muestras de población control.

5.7 Hipótesis de Trabajo de la parte B

En esta parte, planteamos dos hipótesis:

- Hipótesis 1: La mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos presenta una activa producción de IFNs. La producción de estos IFNs contempla a las tres familias de IFNs (IFN tipo I, tipo II y tipo III). La participación de estas vías induce una firma de biomarcadores de las vías de IFNs en la mucosa duodenal de los pacientes ACD.
- Hipótesis 2: La mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos presenta un aumento de células productoras de las citoquinas IL-17 e IL-21 comparada con muestras de población control. Las células productoras de IL-17A son, en su mayoría, linfocitos T, y en menor medida células plasmáticas.

5.8 Resultados

5.8.1 Nivel de expresión de IFNs tipo I y II

Con el fin de analizar la participación de los IFNs tipo I en EC, comenzamos con la evaluación del nivel de expresión del gen *IFNB1*, en paralelo con la medida de *IFNG*. En la **Figura 31**, se observa un aumento del nivel relativo de expresión de ambos genes en la población ACD. El análisis de correlación de la expresión de ambos genes muestra que no hay correlación en el conjunto de los datos, o cuando se analizan las poblaciones ACD y NC por separado (**Figura 31-C**).

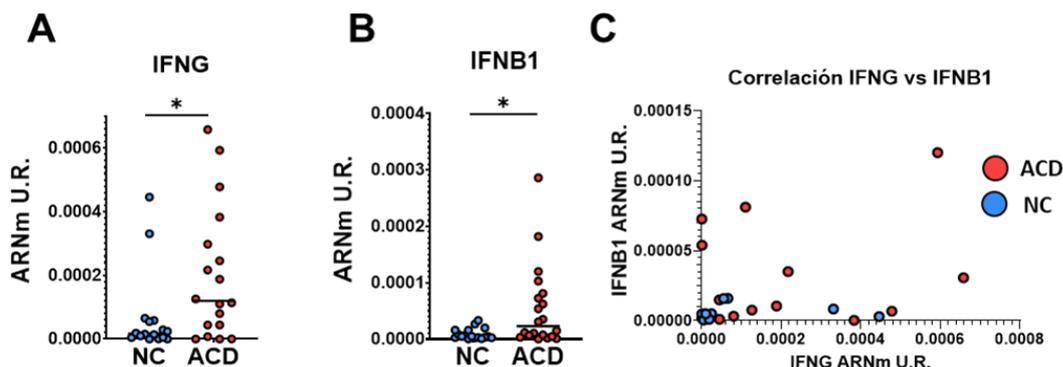


Figura 31-Nivel relativo de ARNm de los genes IFNB1 e IFNG en pacientes ACD. A.- Nivel relativo de ARNm del gen *IFNG* en pacientes No Celíacos (NC, n=16) y pacientes celíacos activos (ACD, n=18). B.- Nivel relativo de ARNm del gen *IFNB1* en pacientes No Celíacos (NC, n=17) y pacientes celíacos activos (ACD, n=20). C.- Correlación entre los niveles relativos de ARNm en pacientes ACD (esferas rojas, n= 15) y NC (esferas azules, n= 10). Los ensayos mostrados en A y B utilizaron el análisis estadístico por Test de Man-Whitney no pareado ($p < 0.05$ (*)), los resultados se muestran como puntos individuales para cada paciente, la barra horizontal indica la mediana de cada población. El análisis de correlación en C se realizó por correlación de Spearman, siendo esta no significativa (con ambas poblaciones, p-Valor: 0.267).

Si bien se conocía que el nivel relativo de expresión de estos genes está aumentado en población celíaca activa, es llamativo que no correlacionen entre sí. Desde el punto de vista de los modelos de patogenia de EC, se espera que un mayor nivel de IFNs tipo I se asocie a una mayor respuesta de $IFN\gamma$. Sin embargo, esto es muy relevante ya que puede poner de manifiesto la presencia de subgrupos de pacientes donde se observe un predominio diferente en la expresión de IFNs tipo I o de $IFN\gamma$.

5.8.2 Niveles de IL-10 en pacientes celíacos

Dado que los niveles relativos de los IFNs pueden afectar diferentes mecanismos, incluso los regulatorios, estudiamos la expresión del gen *IL10*. Este gen fue elegido por sobre FoxP3, CTLA4, debido a que es producido por una gran cantidad de células con un rol regulatorio (Tr1, Tregs, ILCregs, entre otras). En la **Figura 32**, se observa un aumento de los niveles relativos de IL10 en los pacientes ACD, aunque no se encontraron diferencias cuando se analizaron las relaciones IFNs tipo I/IL10 o $IFN\gamma$ /IL10 en estas poblaciones. Las **Figura 32-D y E** muestran que no existe una correlación significativa entre los IFNs y la expresión de gen *IL10*. Sin embargo, para $IFN\gamma$ observamos una tendencia que debería ser evaluada en un estudio empleando un mayor número de muestras.

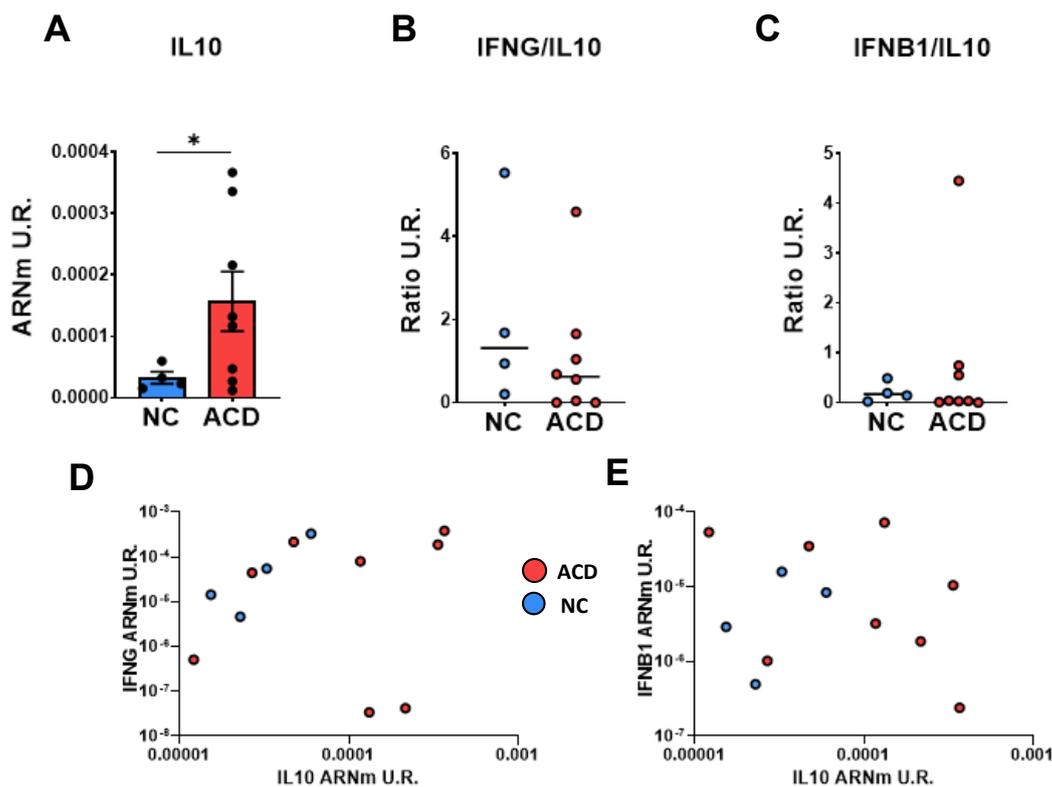


Figura 32- Nivel relativo de ARNm de IL10 en pacientes ACD. A.- Nivel relativo de ARNm del gen IL10 en pacientes No Celíacos (NC, n=4) y pacientes celíacos activos (ACD, n=8). B.- Relación entre los niveles relativos de IFNB1/IL10 en pacientes No Celíacos (NC, n=4) y pacientes celíacos activos (ACD, n=8). C.- Relación entre los niveles relativos de IFN γ /IL10 en pacientes No Celíacos (NC, n=4) y pacientes celíacos activos (ACD, n=8). D y E.- Correlaciones entre el factor IL10 y cada uno de los IFNs evaluados en B y C. Para A se utilizó el análisis estadístico por Test de Student no pareado, pero para el caso de B y C se utilizó el análisis de Man-Whitney no pareado ($p < 0.05$ (*)). Los análisis de correlación en D y E, se realizaron por correlación de Spearman, siendo esta no significativa (con ambas poblaciones, D p-Valor: 0.266; E p-Valor: 0.699).

5.8.3 Nivel de expresión de bio-marcadores de los IFNs tipo I y II

Además de evaluar los niveles de expresión de IFN β e IFN γ , nos interesó analizar la activación de componentes de la vía de señalización de cada uno. Por RT-qPCR, estudiamos el nivel de expresión del biomarcador de IFNs, MX1, así como moléculas moduladoras negativas de la vía, inducidas por IFNs (SOCS1, SOCS3, USP18). En la **Figura 33-A y B**, se observa que los niveles de ARNm de los genes *MX1*, *SOCS1* y *USP18* están aumentados en duodeno de población celíaca, no así los de *SOCS3*.

También se evaluó a los factores IRF1 e IRF8 como marcadores de la actividad del IFN γ . Como se muestra en la **Figura 33-E**, los niveles de ARNm del gen *IRF1* están incrementados en la población ACD respecto a la NC. Además, se evidenció la correlación positiva entre los niveles de expresión de los ARNm para IRF1 e IFN γ , pero no entre IRF1 e IFNB1. El aumento de los niveles de IRF1 correlacionó con una llamativa disminución de IRF8 en los pacientes celíacos activos. En el caso de IRF8 no se detectó una correlación significativa con IFN γ u IFNB1.

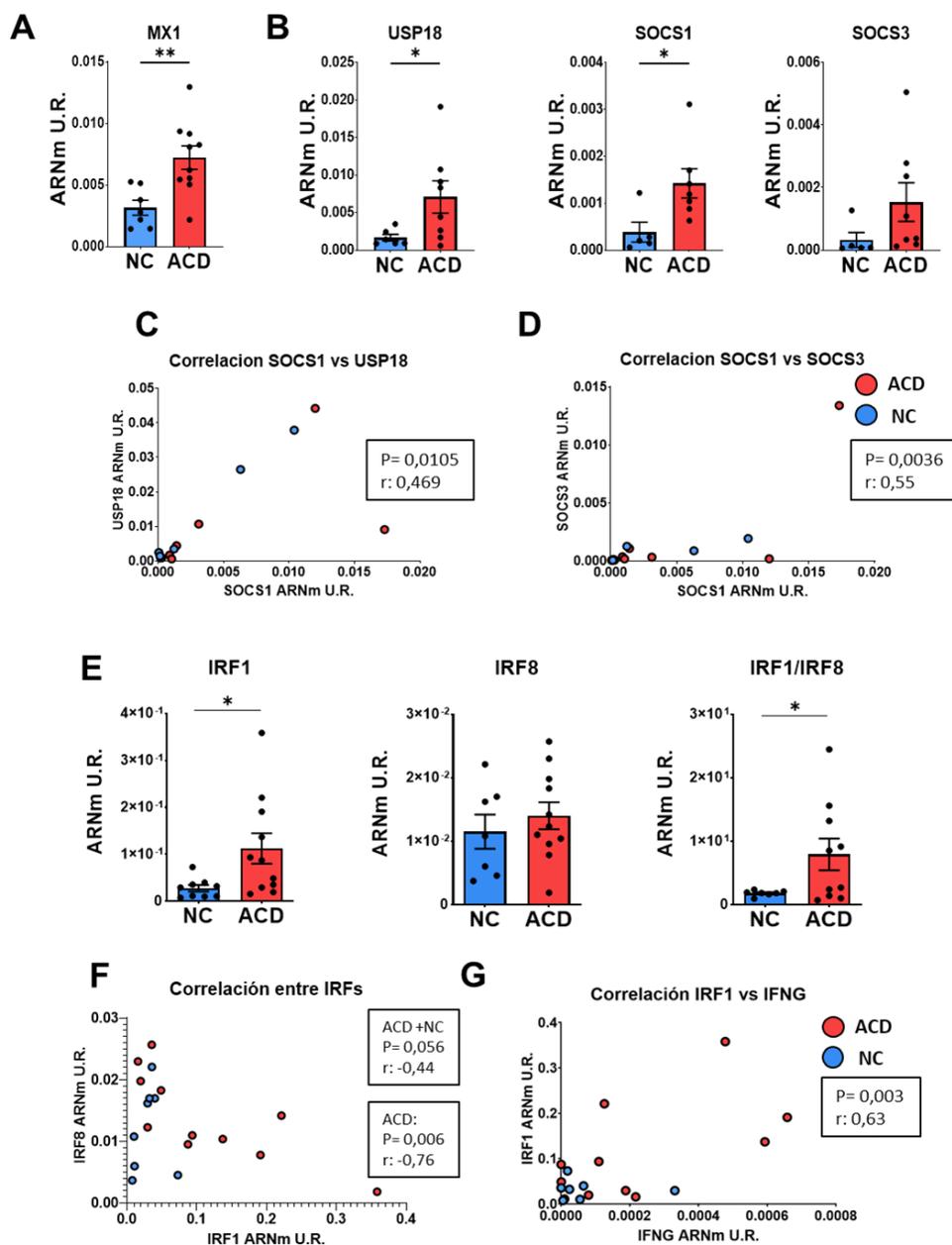


Figura 33- Niveles relativos de expresión de biomarcadores de IFNs en mucosa duodenal. **A.-** Nivel relativo de ARNm del gen *MX1* en pacientes No Celíacos (NC, n=7) y pacientes celíacos activos (ACD, n=10), **B.-** Nivel relativo de ARNm del gen *USP18* (NC, n= 6 y ACD, n= 8), *SOCS1* (NC, n= 5 y ACD, n= 7) y *SOCS3* (NC, n= 5 y ACD, n= 8). **C.-** Correlación entre el nivel relativo de ARNm correspondiente SOCS1 y USP18, se muestran los valores de r de Pearson y p-valor de las correlación considerando población total (ACD, n=7 y NC, n=6) y correlación solo para la población celíaca activa (ACD). **D.-** Correlación entre el nivel relativo de ARNm correspondiente a SOCS1 y SOCS3 (ACD, n=7 y NC, n=6). **E.-** Nivel relativo de ARNm del gen *IRF1* en pacientes No Celíacos (NC, n=9) y pacientes celíacos activos (ACD, n=11), Nivel relativo de ARNm del gen *IRF8* en pacientes No Celíacos (NC, n=7) y pacientes celíacos activos (ACD, n=11) y Relación IRF1/IRF8 en pacientes No Celíacos (NC, n=7) y pacientes celíacos activos (ACD, n=11). **F.-** Correlación entre el nivel relativo de ARNm correspondiente a IRF1 e IRF8, se muestran los valores de r de Pearson y p-valor de las correlación considerando población total (ACD, n=11 y NC, n=7) y correlación solo para la población celíaca activa (ACD). **G.-** Correlación entre el nivel relativo de ARNm correspondiente a IRF1 e IFNG (ACD, n=11 y NC, n=7). Los ensayos mostrados utilizaron el análisis estadístico por Test de Student no pareado ($p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**)), representadas en gráficos de barra con sus respectivos SEM. Las correlaciones fueron analizadas con el análisis de Correlación de Pearson, en el recuadro se informa el p-valor y el r de Pearson.

5.8.4 Niveles de expresión de IFNs tipo III

Dado que en las mucosas se encuentra un aporte relevante de los IFNs tipo III, es interesante que estos factores no hayan sido estudiados en la EC. Por este motivo, nos interesó evaluar a IFNL1, IFNL2 e IFNL3 en los pacientes ACD.

Dada la gran similitud genética entre los genes *IFNL2* e *IFNL3*, y a las dificultades para diseñar un par de cebadores específicos para cada uno, se diseñó un único par de cebadores, y los denominaremos IFNL2/3. IFNL4 no fue evaluado debido a que se presenta como un pseudogen en varias poblaciones humanas (O'Brien, Prokunina-Olsson and Donnelly, 2014).

En **Figura 34**, se muestra que existen mayores niveles de expresión de IFNL1 e IFNL2/3 en duodeno de los pacientes celíacos activos. Mientras que se obtuvo una tendencia no significativa para IFNL1. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre

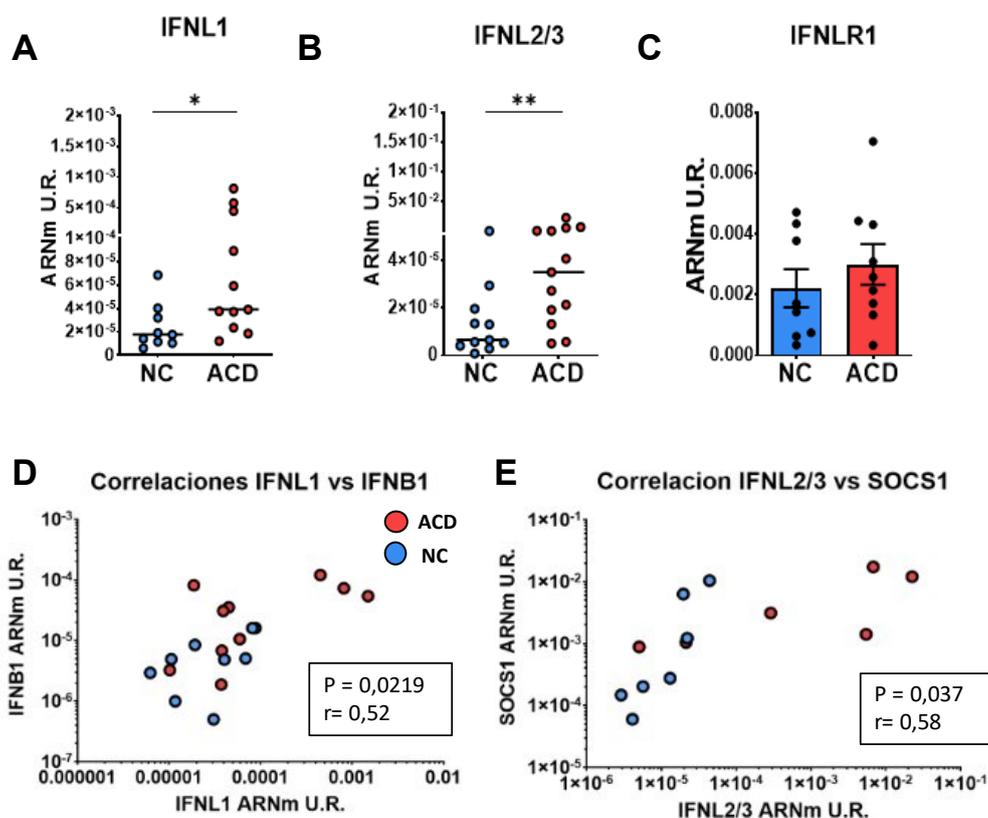


Figura 34- Niveles relativos de ARNm de IFNL1 y IFNL2/3 en pacientes ACD y NC. **A.-** Nivel relativo de ARNm del gen IFNL1 en pacientes No Celíacos (NC, n=9) y pacientes celíacos activos (ACD, n=11). **B.-** Nivel relativo de ARNm del gen IFNL2/3 en pacientes No Celíacos (NC, n=11) y pacientes celíacos activos (ACD, n=13). **C.-** Nivel relativo de ARNm del gen IFNL1 en pacientes No Celíacos (NC, n=8) y pacientes celíacos activos (ACD, n=9). Se muestran los gráficos con los ejes cortados para mejor visualización de los datos. En los casos de IFNL1 e IFNL2/3, los análisis para evaluar normalidad indicaron que se trataban de poblaciones con distribución no normal. Para IFNL1 e IFNL2/3 se utilizó el análisis estadístico por Mann-Whitney. Para IFNL1 el análisis estadístico utilizado fue Test de Student. Según la distribución fuera normal se representó con gráfico de barra y su respectivo SEM, para poblaciones con distribuciones no normales se representaron los valores de cada paciente y la mediana. **D.-** Correlación entre IFNL1 e IFNB1 (NC, n=8 y ACD, n=10). **E.-** Correlación entre IFNL2/3 y SOCS1 (NC, n=8 y ACD, n=6). Los gráficos D y E, muestran los datos en formato logarítmico para una mejor visualización. El análisis estadístico empleado fue el test de Correlación de Pearson, en cada gráfico se aclara el p-valor y el parámetro “r” del test.

IFNB1 e IFNL1, no así con IFN2/3. Por su parte, este último mostró correlación con SOCS1. Por todo ello, podemos afirmar que existe una inducción de IFNs tipo III en los pacientes celíacos activos. A su vez, la correlación positiva entre estos IFNs y los biomarcadores de IFNs tipo I sugieren una inducción controlada por factores análogos.

5.8.5 Niveles de expresión de genes *VEGFA* y *HIF1A*

El análisis de los niveles de expresión relativa de los genes *HIF1A* y *VEGFA* por RT-qPCR en duodeno, mostró que se encuentran aumentados en la población celíaca activa (**Figura 35**). Por otro lado, es interesante la correlación observada entre *HIF1A* e *IFNG* y, en particular, con *IRF1*. No se encontraron correlaciones entre *VEGFA*, y ninguno de los demás genes evaluados en este capítulo.

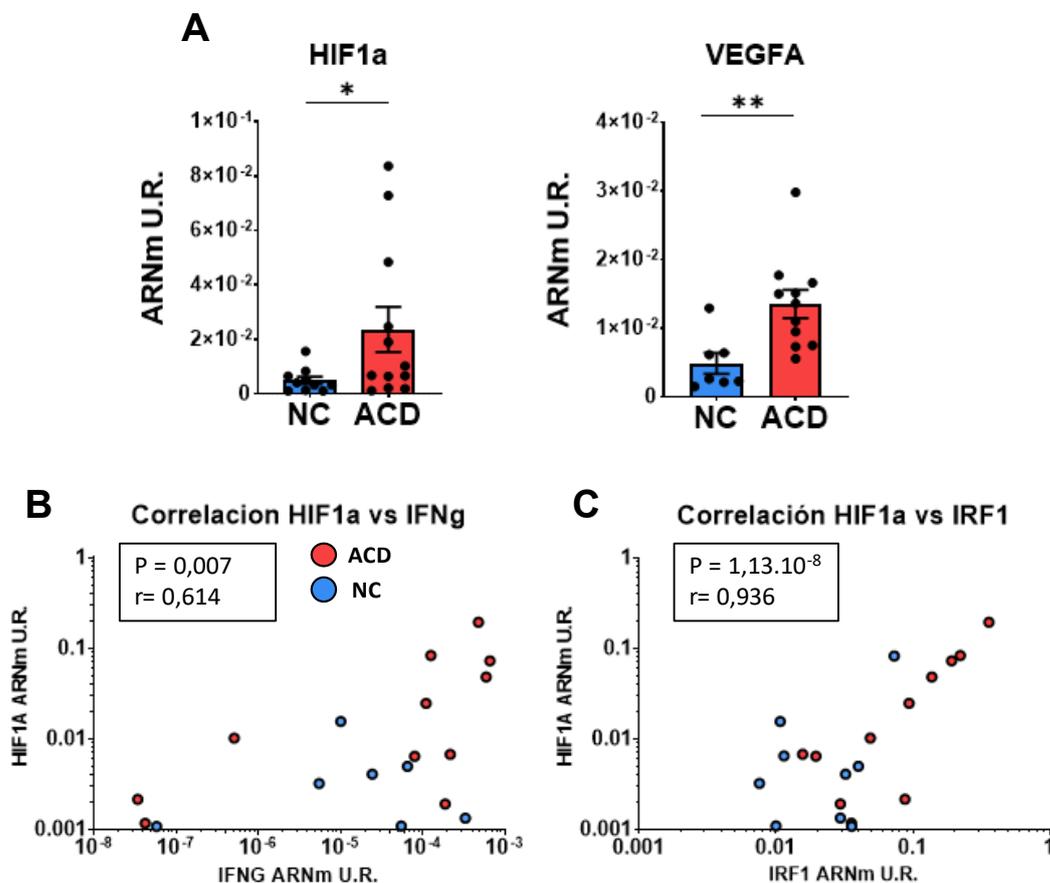


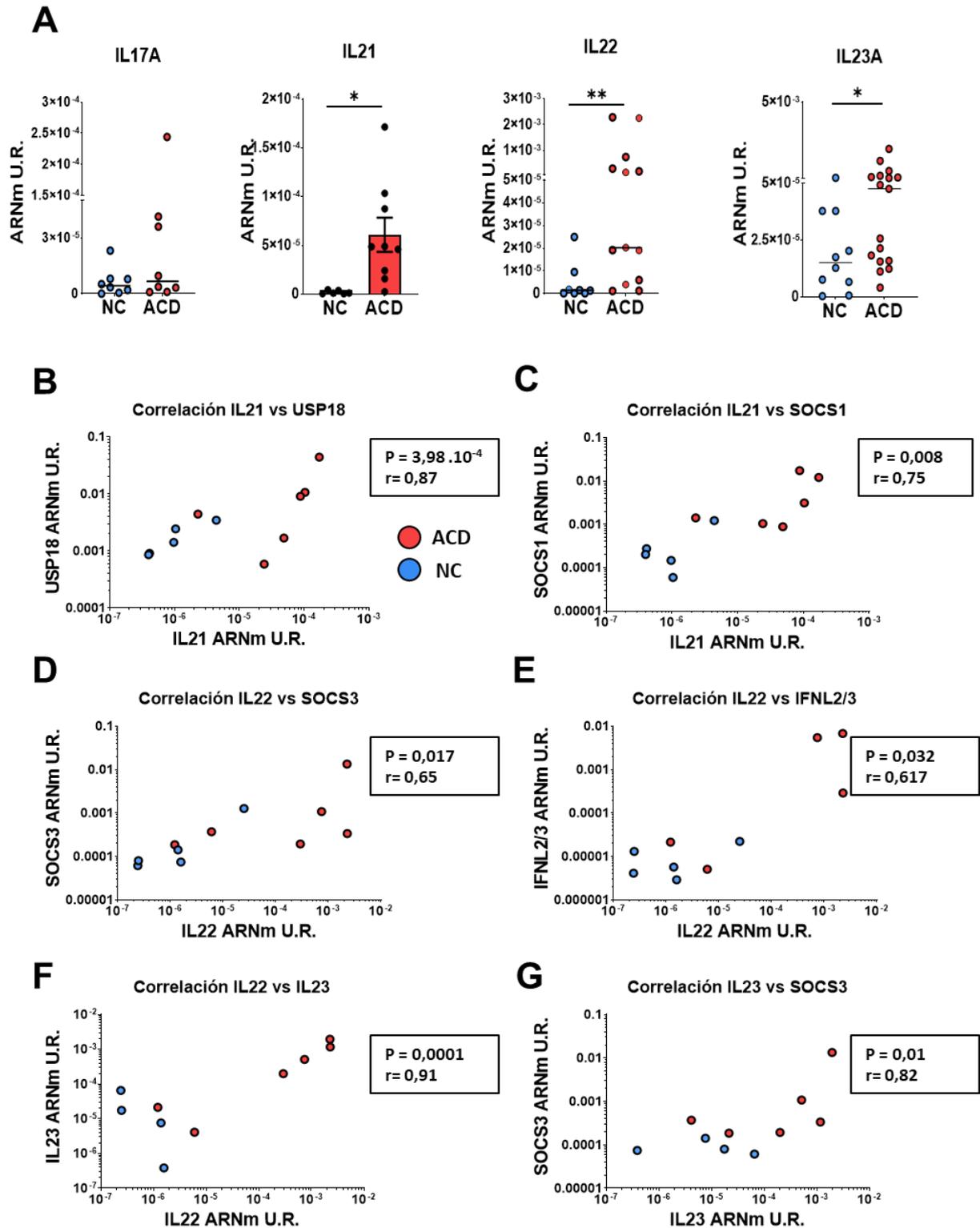
Figura 35- Comparación del nivel de expresión de los genes *HIF1A* y *VEGFA*. A.- Nivel relativo de ARNm del gen *HIF1A* en pacientes No Celíacos (NC, n=10) y pacientes celíacos activos (ACD, n=12), en el gráfico de la izquierda se representa el nivel relativo de ARNm del gen *VEGFA* en pacientes No Celíacos (NC, n=7) y pacientes celíacos activos (ACD, n=11). Los ensayos mostrados son gráficos de barra más sus respectivos SEM, se utilizó el análisis estadístico por Test de Student no pareado ($p < 0.05$ (*); $p > 0.001$ (**)). B.- Correlación entre los niveles relativos de expresión de los genes *HIF1A* e *IFNG* (NC, n= 7 y ACD, n=11). C.- Correlación entre los niveles relativos de expresión de los genes *HIF1A* e *IRF1* (NC, n= 10 y ACD, n=11). El análisis estadístico empleado fue el test de Correlación de Pearson, en cada grafico se aclara el p-valor y en r del test.

5.8.6 Evaluación del eje de citoquinas IL-17A/IL-21 en pacientes ACD

Realizamos el análisis de expresión por RT-qPCR para los transcritos correspondientes a genes íntimamente relacionados con la vía de IL-17A (*IL17A*, *IL21*, *IL22* e *IL23A*). Se encontró un incremento en el nivel de expresión relativo para los transcritos de los genes *IL21*, *IL22* e *IL23A*, en duodeno de pacientes celíacos activos comparado con controles (**Figura 36-A**). Es de destacar que no se encontró un aumento de los transcritos del gen *IL17A*, ni tampoco una correlación entre el nivel de expresión de este gen y genes de la vía de IL-17A/IL-21. Sin embargo, si se encontraron correlaciones positivas entre IL-21 con varios biomarcadores de IFNs (USP18, SOCS1). También se encontraron correlaciones significativas entre IL-22 con SOCS3 y con IFNL2/3. Para el caso de IL-23A se encontró una correlación con IL-22 y con SOCS3. Esta serie de resultados sugiere la existencia de una inducción simultánea de factores inflamatorios correspondientes a la vía de IFNs y genes *IL21*, *IL22* e *IL23A*. Extrañamente, no encontramos evidencia sobre una correlación entre estos factores e IFNB1 o IFNG. Si bien esto no demuestra una falta de asociación entre las vías, pues, otros factores como MX1 tampoco mostraron una correlación con estos factores a pesar de que su biología lo indica. Por lo tanto, consideramos que pueden existir contribuciones de otros factores.

Por ende, estas observaciones sugieren que la respuesta inflamatoria en pacientes celíacos activos presenta un incremento en la expresión de genes de la vía de IFNs coexistente con los genes *IL21*, *IL22* e *IL23A*.

Figura 36- Análisis del nivel relativo de expresión de genes de la vía IL-17A/IL-21. **A.-** Estudio del nivel de expresión del gen *IL-17A* (NC, n=7; ACD, n=8), *IL-21* (NC, n=6; ACD, n=9), *IL-22* (NC, n=10; ACD, n=12), *IL-23A* (NC, n=10; ACD, n=17). Los resultados de IL-21 se muestran en gráficos de barra con sus respectivos SEM. En los demás casos, se muestran los valores puntuales con una barra referida a la mediana por ser poblaciones con distribuciones no normales. El análisis estadístico para IL-21 fue Test de Student no pareado, con corrección de Welch si fuera necesaria ((*) p<0.005). En el caso de IL-23A, IL-17A e IL-22 el análisis fue por el test de Mann-Whitney ((*) p<0.05, (**) p<0.001). **B.-** Correlación IL-21 vs USP18 (NC, n=5; ACD, n=6). **C.-** Correlación IL-21 vs SOCS1 (NC, n=5; ACD, n=6). **D.-** Correlación IL-22 vs SOCS3 (NC, n=5; ACD, n=6). **E.-** Correlación IL-22 vs IFNL2/3 (NC, n=5; ACD, n=6). **F.-** Correlación IL-22 vs IL-23 (NC, n=4; ACD, n=6). **G.-** Correlación IL-23 vs SOCS3 (NC, n=4; ACD, n=6). Para el caso de B-G, se muestran correlaciones significativas, según test de Correlaciones de Pearson, entre miembros de la vía de IFNs y la vía IL-17A/IL-21. La escala en cada gráfico es logarítmica para una mejor visualización de la distribución de todos los resultados. Se inserto una caja de texto con el detalle del p-valor y r de Pearson para cada caso.



El análisis por inmunofluorescencia en cortes de biopsias duodenales para investigar la expresión y caracterizar las células que expresan IL-17A e IL-21 se muestra en la **Figura 37**. Se observa una mayor expresión de IL-21 en la mucosa y en particular en el epitelio de los pacientes ACD. Para IL-17A, no se encontraron diferencias en los tres compartimientos evaluados. Es de destacar que la densidad de células IL-21⁺ es, en

promedio, 10 veces superior al de las IL-17A⁺. Esto sugiere una inducción de la citoquina IL-21, pero no así para la IL-17A. Además, este resultado demuestra que ambas citoquinas se expresan en células diferentes.

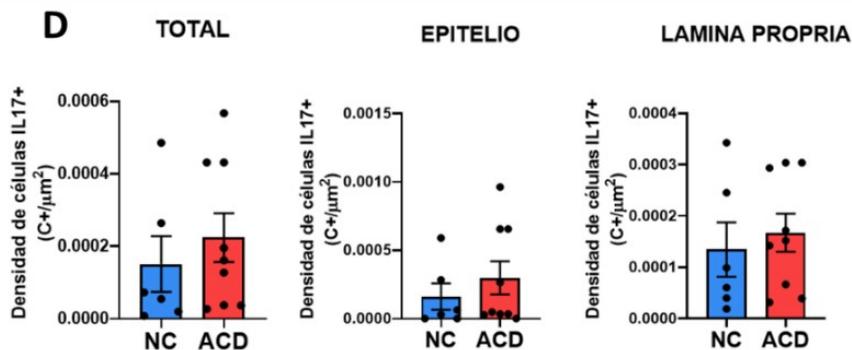
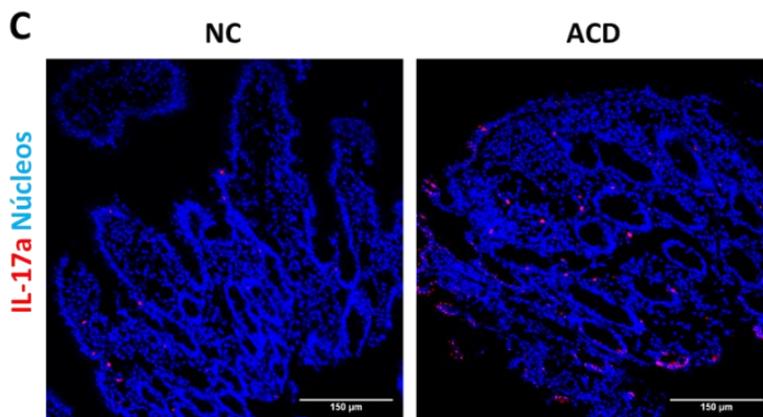
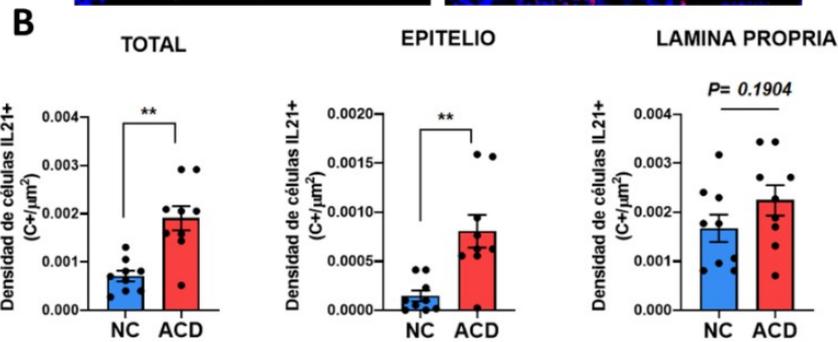
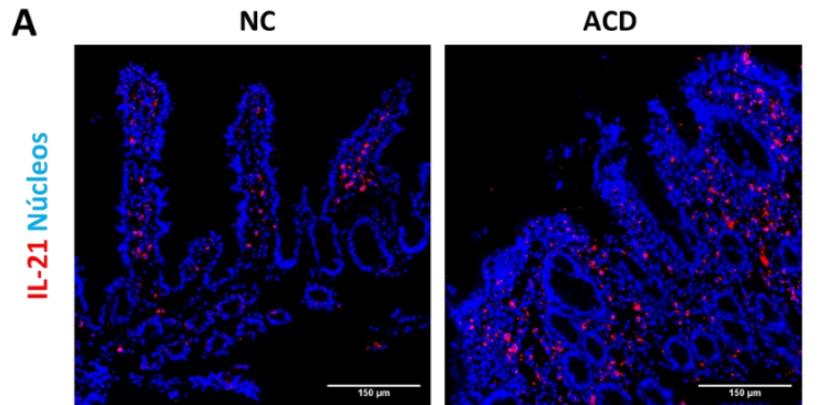


Figura 37- Análisis de la expresión de las citoquinas IL-21 e IL-17A en la mucosa duodenal.
A. y C.- Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de IL-21 (A) e IL-17A (C) en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos (ACD) y controles no celíacos (NC). Las imágenes se obtuvieron con una magnificación total de 200X. **B.-** Recuento de células IL-21⁺ de la mucosa total, el epitelio o la *lamina propria*, en pacientes ACD (n=9) y NC (n=9). **D.-** Recuento de células IL-17A⁺ de la mucosa total, el epitelio o la *lamina propria*, en pacientes ACD (n=9) y NC(n=6). Los resultados se representaron con gráficos de barra y sus respectivos SEM. En todos los casos se utilizó el ensayo estadístico de Test de Student no pareado, con corrección de Welch si fuera necesaria ((*) p<0.05, (**) p<0.01).

Debido a que IL-17A es producida por diferentes células, realizamos un análisis por inmunofluorescencia con marcadores de linaje: CD3 (linfocitos T) y CD138 (células plasmáticas). En este estudio, encontramos células CD3⁺IL-17A⁺ pero no células CD138⁺IL-17A⁺ (Figura 38).

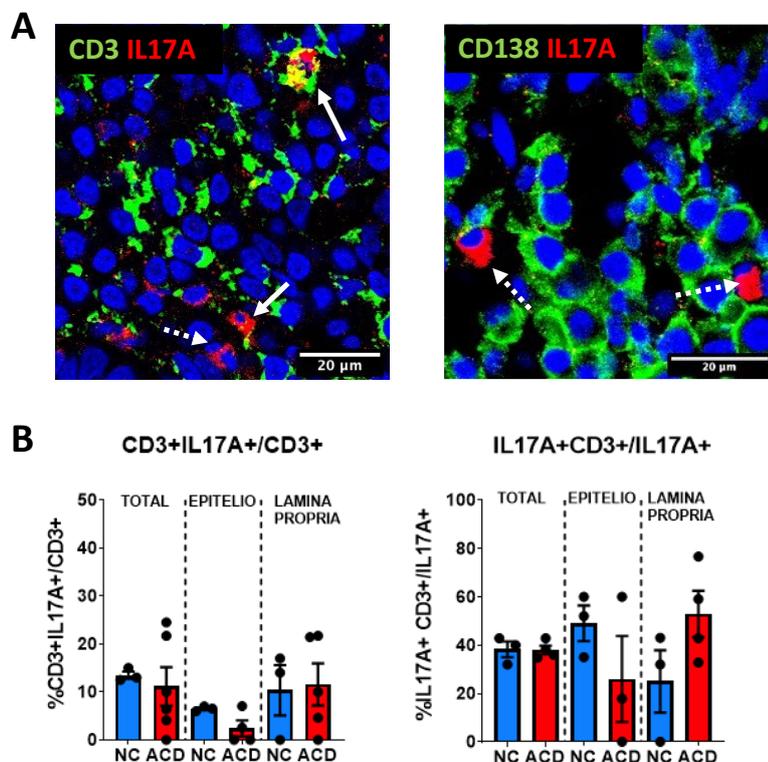


Figura 38- Análisis de las diferentes poblaciones celulares que expresan IL-17A en mucosa duodenal. **A.-** Imágenes representativas de inmunofluorescencia para IL-17A (rojo) y CD3 (verde) en la izquierda y a la derecha IL-17A (rojo) y CD138 (verde). En ambos casos, los núcleos se muestran en azul. En la imagen se encuentran señaladas algunas de las células doble positivas con flechas blancas, y con flechas entrecortadas se indican las células simple positivas para IL17A. **B.-** A la izquierda se muestran los resultados de los recuentos (%) células CD3⁺ IL-17A⁺ dentro de la población de células CD3⁺ (NC, n=3; ACD, n=6). A la derecha se muestran los resultados de los recuentos (% del total) de células IL-17A⁺ CD3⁺ dentro de la población de células IL-17A⁺ (NC, n=3; ACD, n=4). En B, los gráficos de barra muestran el valor promedio de las observaciones y las barras más finas indican el error estándar (SEM). En ambos casos los análisis de comparación se realizaron por Test de Student no pareado para cada compartimiento por separado.

En el análisis de la producción de IL-21 en duodeno observamos que la mayor parte de las células IL-21⁺ son CD3⁺. En los pacientes celíacos, estas células T IL-21⁺ constituyen el 20-30% del total de las células T, un 10-15% en el epitelio y un 30-40% en la *lamina propria*. A su vez, se observa un incremento en el número de células T IL-21⁺ en la totalidad de la mucosa y en el compartimiento epitelial y de *lamina propria* (**Figura 39**).

Estos resultados se corresponden con los encontrados por RT-qPCR, y reflejan un incremento de la expresión de IL-21, pero sin cambios en IL-17A. Comprobamos que la expresión de IL-21 es principalmente realizada por linfocitos T, mientras que solo aproximadamente un 40% del total de células que expresan IL-17A son células T. Al mismo tiempo, es de destacar que se observa una mayor cantidad de células T IL-21⁺ respecto a las T IL-17A⁺, indicando la existencia de poblaciones T, IL-21⁺ IL17A⁻. Finalmente, las células IL-17A⁺ que no son linfocitos T, tampoco son células plasmáticas (CD138⁺).

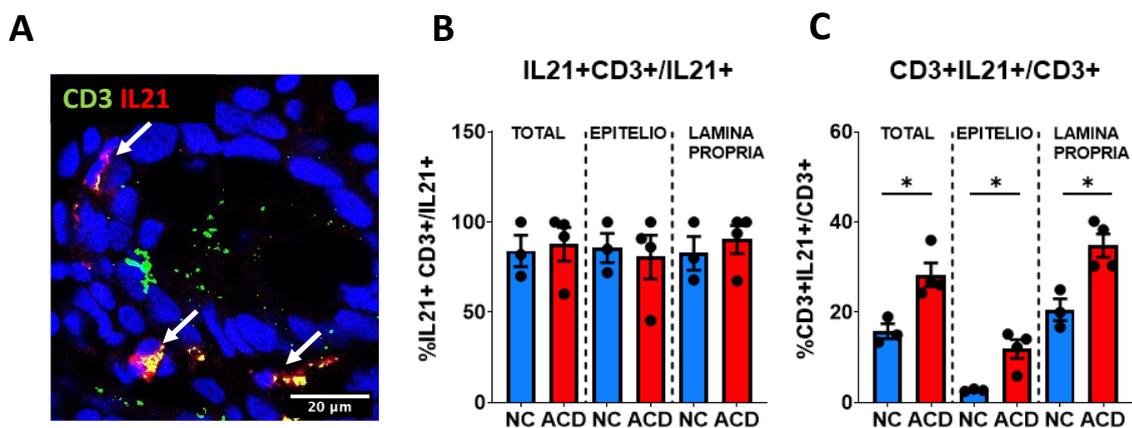


Figura 39- Análisis de las diferentes poblaciones celulares que expresan IL-21 en mucosa duodenal. A.- Imagen representativa del análisis por inmunofluorescencia de secciones de duodeno marcando, IL-21 (rojo), CD3 (verde) y núcleos (azul). En la imagen se encuentran señaladas algunas de las células doble positivas con flechas blancas B.- A la izquierda se muestran los resultados de los recuentos (%) de células IL-21⁺CD3⁺ dentro de la población de células IL-21⁺ (NC, n=3; ACD, n=4). C.- Se muestran los resultados de los recuentos (%) de células CD3⁺IL-21⁺ dentro de la población de células CD3⁺ (NC, n=3; ACD, n=4). En B y C, los gráficos de barra muestran el valor promedio de las observaciones y las barras más finas indican el error estándar (SEM). En ambos casos, los análisis de comparación se realizaron por Test de Student no pareado para cada compartimiento por separado ((*) p<0.05).

5.8.7 Análisis de tendencias poblacionales del sistema IL-17A/IL-21

Basándonos en diferentes publicaciones ya mencionadas en la introducción, se considera que la expresión de diferentes marcadores del eje IL-17A/IL-21 puede correlacionar con el grado de enteropatía y la edad de los pacientes ACD. Para evaluar esta hipótesis, se estudió la distribución del nivel de expresión de los genes asociados a la vía (*IL17A*, *IL21*, *IL22*, *IL23A*) y densidad de células IL-17A⁺ o IL-21⁺. En este estudio, no se observaron diferencias entre el nivel de expresión de los genes asociados a la vía o a diferentes grados de enteropatía dentro de la población ACD. Solo se encontraron diferencias significativas entre el grado cero (o normal) en la histología y los genes IL21, IL22 e IL23A. Tampoco se observó correlación entre la edad y el nivel de expresión de los genes dentro de la población ACD (**Figura 40**).

El análisis de la densidad de células IL-17A e IL-21 en la mucosa duodenal, tampoco mostró correlación con el grado de enteropatía. Solo para IL-21 se observó un aumento en la enteropatía 3. Tampoco se encontró una correlación con la edad de los pacientes.

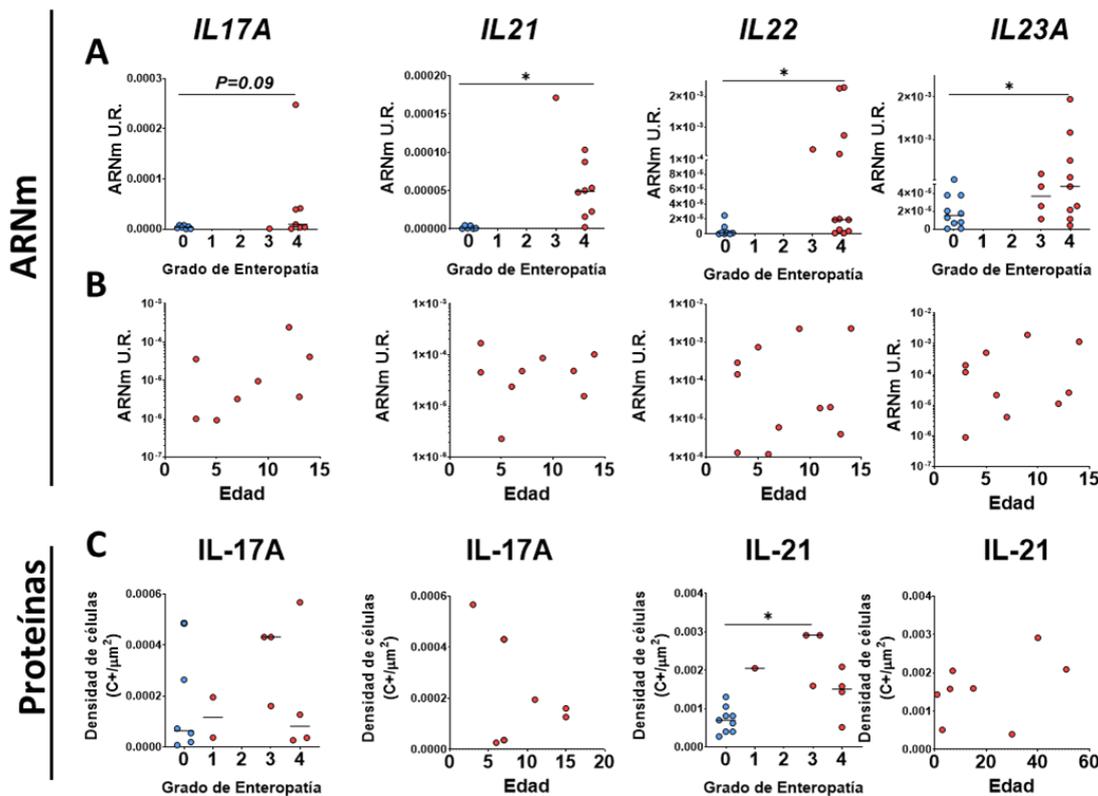


Figura 40- Análisis poblacional de la vía IL-17A/IL-21. **A.-** Análisis del nivel de expresión de genes *IL17A*, *IL21*, *IL22*, *IL23A* según el grado de enteropatía, siendo cero para una histología normal y 4 el máximo grado de severidad del daño. **B.-** Análisis del nivel de expresión de genes *IL17A*, *IL21*, *IL22*, *IL23A* según la edad para pacientes ACD. **C.-** Análisis de la densidad de células positivas para *IL-17A* e *IL-21* por área de la mucosa duodenal respecto al grado de enteropatía y la edad. En todos los casos, los datos de cada paciente se muestran con color rojo para los ACD y azul para NC. En el caso de los gráficos de grupo se muestran barras horizontales correspondientes a la mediana. Los análisis de grupo se realizaron por Test de ANOVA post corrección de Tukey en caso de datos distribuidas paramétricamente, en el caso de datos no paramétricos se realizó análisis por Kruskal-Wallis post corrección de Dunn. Las correlaciones se realizaron por test de Pearson. (* $p < 0.05$).

5.8.8 Análisis en conjunto de las vías estudiadas

Con el objetivo de analizar si las vías asociadas a la respuesta de IFNs se presentan en los mismos pacientes que la vía de citoquinas analizadas, recurrimos a un análisis por componentes principales o “PCA”. A diferencia de las correlaciones antes mostradas, el PCA tiene la ventaja de la simplicidad visual de su representación para asociar las variables estudiadas. Debemos mencionar que para la realización del PCA, recurrimos a un método estadístico para la imputación de datos faltantes (Dray and Josse, 2015). Esto se debió a que no se pudieron realizar las medidas de las 19 variables (genes a estudiar) en el total de los pacientes. Con el objetivo de cumplir con los requisitos del software de imputación de datos (paquete “missMDA” para el leguaje R), solo se incluyeron pacientes que al menos tengan medidas 6 de las 19 variables estudiadas. Por lo tanto, este análisis

solo aporta información cualitativo y debe considerarse como complemento de las comparaciones realizadas en las secciones anteriores.

Las primeras cuatro dimensiones analizadas permitieron diferenciar el grupo de pacientes ACD y NC. Aunque se observa una gran dispersión dentro del grupo de los pacientes ACD (**Figura 41-A**). Esta característica impide la obtención de clústeres (o subgrupos) diferentes por diferentes métodos estadísticos, probablemente debido al número limitado de pacientes que pudieron ser estudiados.

La **Figura 41-A** muestra el análisis para las dimensiones más relevantes. HIF1A e IRF1 se encuentran incrementados en el mismo grupo de pacientes ACD. Esto concuerda con los análisis de regresión lineal antes mostrado. De manera similar, IFN γ parece encontrarse próximo a estas variables, en concordancia con la correlación IRF1-IFN γ y HIF1A-IFN γ . En el otro extremo, encontramos una leve asociación entre IL-10, USP18. Esto es esperable en base a la ausencia de correlación para IFNL2/3 e IL-10 con IFN γ e IRF1. En la porción media, se encuentran las variables menos expresadas en los pacientes no celíacos e incrementadas en los pacientes ACD (IL22, IL21, SOCS1). A su vez, la asociación de algunas de estas variables ya había sido descrita en las correlaciones anteriormente mostradas para: IL-22/SOCS3, IL-23/SOCS3, IL-22/IL-23, IL-21/SOCS1.

Las contribuciones de MX1, IFNB1, IFNL2/3 e IFNL1 se pueden observar en las dimensiones 3 y 4 (**Figura 41-B**). Aquí se observan las asociaciones entre IFNL2/3, USP18 y MX1 para un subgrupo pequeño de pacientes ACD. Mientras que IL17A, IFNL1, y en menor medida IFNB1, se agrupan entre sí. Esto concuerda con las asociación descrita entre IFNB1 e IFNL1. Además, la pobre asociación con IFNB1 en los pacientes ACD puede explicarse por la eliminación de pacientes de alta expresión de esta variable que no cumplían con el requisito de 6 medidas consecutivas.

En conclusión, la expresión tan dispersa de las variables asociadas a los pacientes ACD confirma la existencia de diferencias entre los pacientes. Además, esto resalta la necesidad de realizar estudios con un gran número de pacientes de diferente presentaciones y grupos demográficos para la comprensión integral de las vías estudiadas.

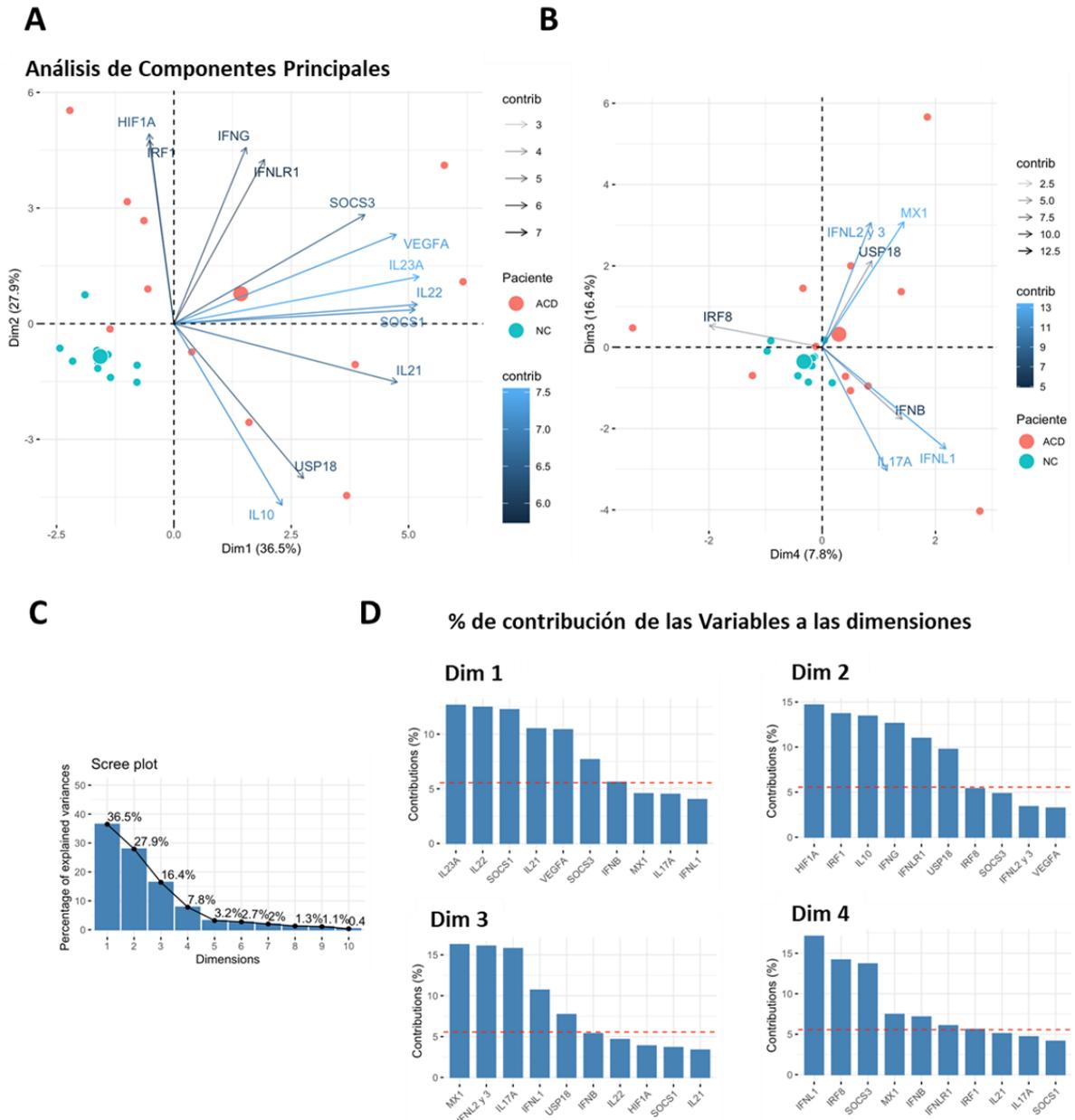


Figura 41- Análisis de componentes principales de la expresión génica de los marcadores de estudio. **A.-** Gráfico de las dimensiones 1 y 2 del PCA. Se muestran puntos individuales para los pacientes NC (n = 10) y ACD (n = 11), y flechas para las variables estudiadas. **B.-** Gráfico de las dimensiones 3 y 4 del PCA. La altura y color de las flechas depende de la contribución porcentual de las mismas a cada dimensión graficada. En cada gráfico se muestran las variables de mayor contribución para las dimensiones. **C.-** El gráfico muestra la contribución porcentual de cada dimensión a la varianza total. **D.-** Los gráficos muestran la contribución porcentual de las 10 variables más importantes para las dimensiones 1-4.

5.9 Discusión y perspectivas futuras

En el estudio de las vías inflamatorias asociadas con la patogenia de EC, demostramos que los pacientes celíacos presentan una mayor producción de distintos tipos de IFNs. En el caso especial de los IFNs tipo I, encontramos un aumento de los niveles de transcripción del gen *IFNB1*. Además, también encontramos una marcada inducción de diferentes genes biomarcadores de esta vía como *MX1*, *USP18*, *SOCS1*. Por otro lado, el mismo comportamiento fue encontrado para los IFNs tipo II, es decir *IFNG*, el cual se encontró con niveles superiores a los hallados en la población no celíaca. Simultáneamente, se encontró un biomarcador de la vía de IFNs, el IRF1 incrementado en la población ACD y con una correlación positiva con el nivel de expresión del gen *IFNG*. El IRF8 no resultó estar incrementado en la población ACD a pesar de ser ampliamente inducido por *IFNG* e IFNs tipo I en diversas situaciones y tipos celulares (McGough *et al.*, 2008). Más curioso aún resulta ser la correlación inversa entre IRF8 e IRF1 en pacientes ACD. Esto va en contra de lo esperable según lo conocido por la biología de la vías de inducción de estos factores. En conjunto, estos resultados son en parte análogos a los encontrados en publicaciones anteriores en población celíaca europea (Nilsen *et al.*, 1998; Monteleone *et al.*, 2001; Pietz *et al.*, 2017).

Es de destacar el incremento en los niveles de expresión de los genes *USP18* y *SOCS1* en pacientes celíacos activos. Aunque estos resultados podrían interpretarse como una inhibición de la vía de IFNs, estos marcadores deben ser considerados como reguladores de la vía, que son inducidos frente a una señal persistentes por parte de los IFNs. Al mismo tiempo, debemos tener en cuenta que la expresión de los factores *SOCS1* y *SOCS3* son controlados no solo por los IFNs, sino también por la vía TAM estudiada en el siguiente capítulo (Parte C). Por otra parte, es esperable encontrar una preferencia entre los *SOCS1* y 3, con un marcado incremento de *SOCS1* en pacientes ACD, característico de las respuestas tipo 1 (Egwuagu *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, dado que estos son genes regulados por IFNs, su expresión nos indica una mayor actividad de la vía de IFNs en duodeno de pacientes con EC activa, y el análisis por PCA revela que *SOCS3* está enriquecido en algunos pacientes ACD. Por lo tanto, es posible que en el análisis de una población mayor hubiéramos encontrado una diferencia entre las cohortes de pacientes.

Por otro lado, resulta llamativo que el nivel de expresión del gen *MX1* no correlacione con ninguno de los dos IFNs medidos ni con otros factores asociados a la vía. Una hipotética explicación sería considerar que *MX1* es un marcador más sensible a diferentes IFNs que los demás marcadores evaluados y, por lo tanto, presente una cinética de expresión diferente.

A pesar de la relevancia funcional de los IFNs tipo III en la mucosa intestinal, estos no han sido estudiados en el contexto de EC. En este estudio, encontramos un aumento de *IFNL1* e *IFNL2/3* en la mucosa duodenal de los pacientes ACD. A su vez, encontramos una correlación entre *IFNL1* e *IFNB1*, así como *IFNL2/3* correlacionó con *SOCS1*. Esto sugiere que la vía de IFNs tipo I y III se encuentran reguladas por eventos similares como consecuencia, probablemente, de la similitud en sus vías de inducción.

Un fenómeno llamativo observado es la falta de correlación entre *IFNL1* y *IFNL2/3*, y las diferentes direcciones de sus contribuciones en el análisis de PCA. Esto indicaría que los pacientes ACD presentan preferencias en la inducción del tipo de IFNs tipo III. En este sentido, es posible que los IFNLs presenten diferentes preferencias en los factores transcripción que inducen su expresión ya que, por ejemplo, los IRFs inducen diferencialmente a los IFNLs. De este modo, *IFNL1* es estimulada por vías dependientes

del IRF1, mientras que IFNL2/3 dependen selectivamente de IRF3/7 (Odendall *et al.*, 2014; Lazear, Nice and Diamond, 2015).

Es interesante que no hayamos encontrado cambios nivel de expresión de IFNLR1 entre las poblaciones analizadas, cuando se ha demostrado su inducción frente a algunas de las citoquinas inflamatorias asociadas con EC activa (Read *et al.*, 2019). Sin embargo, debemos tener en cuenta que la expresión de este receptor en intestino está principalmente asociada a los enterocitos, y es inhibida en situaciones de pérdida de polarización de las células epiteliales (Pott *et al.*, 2011; Bhushal *et al.*, 2017), como ocurre en intestino delgado de pacientes celíacos (Schumann *et al.*, 2017). Por lo tanto, es posible que la expresión total del receptor IFNLR1 se encuentre determinada por diferentes factores en las poblaciones celulares. Por esto, la caracterización de la expresión de IFNLR1 requiere otros estudios para obtener una mejor descripción de este eje.

Los factores HIF1A y VEGFA se encontraron transcripcionalmente aumentados en la EC activa. Estudios de otros grupos de trabajo mostraron que VEGFA (Rezaei-Tavirani, Rostami-Nejad and Montazar, 2019) y HIF1 α (Vannay *et al.*, 2010) se asociaban a EC. La importancia de estos factores en la EC puede ser múltiple. Por un lado, varias de las funciones proinflamatorias mediadas por IFN γ en células macrofágicas requiere de la expresión de HIF1 α (Braverman *et al.*, 2016). Este factor también afecta la denominada inmunidad entrenada (Corcoran and O'Neill, 2016; Peng *et al.*, 2016) favoreciendo las respuestas de macrófagos M1, e interviene en la liberación de alarminas por necroptosis en macrófagos M1 estimulados con IFN γ (Karshovska *et al.*, 2019). A su vez, la pérdida de la estructura de barrera en el epitelio mediado por IFN γ tiene como intermediario intracelular la inducción de HIF1 α (Yang *et al.*, 2014). Esto último es relevante, dado que Vannay y col. mostraron que la mayor localización de dicho factor era encontrada en enterocitos y células subepiteliales (Vannay *et al.*, 2010).

HIF1 α no solo es requerido para algunas de las funciones inflamatorias comandadas por los IFNs, sino que estos también regulan su expresión en ciertos modelos. De esta forma, la inducción de HIF1 α pueden relacionarse con la vía NF-kB, y con Transglutaminasa 2 (TG2). Algunos MAMPs y DAMPs activan a la vía NF-kB (p65/p50), mientras que TG2 intracelular puede unirse a p65/50 e inducir selectivamente la producción de HIF1 α (Kumar and Mehta, 2012; Kumar *et al.*, 2014). A su vez, la TG2 se encuentra fuertemente inducida en EC, en especial debido a los altos niveles de IFN γ (Bayardo *et al.*, 2012). Por todo ello, podemos interpretar que la fuerte correlación en el nivel de expresión de HIF1 α con IFN γ e IRF1 se debe al control de su expresión por la vía de IFNs tipo II.

En cuanto al VEGFA, pocos trabajos han estudiado a este factor en el contexto de la enfermedad celíaca. Solo un trabajo reciente menciona su medición en biopsias de pacientes ACD (Rezaei-Tavirani, Rostami-Nejad and Montazar, 2019) y lo considera un nodo importante entre redes de interacción de los genes evaluados. Sin embargo, al igual que HIF1 α se desconoce su potencial rol en la enfermedad. Por otra parte, es ampliamente conocido el rol de HIF1 α como regulador positivo de la expresión de VEGFA (Forsythe *et al.*, 1996; Dengler, Galbraith and Espinosa, 2014), y a pesar de la ausencia de correlación entre estos factores en los pacientes ACD, es posible plantearse una posible interacción. De hecho, las interacciones entre estos factores se han visto relacionadas con la actividad proinflamatoria de células T citotóxicas (Palazon *et al.*, 2017), células Th17 (Gaffen *et al.*, 2014), como también en la homeostasis de la vasculatura (Forsythe *et al.*, 1996) y el epitelio (Song *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de que en el análisis por PCA este factor se asocia con la expresión de IL22 e IL23A, no hallamos correlaciones entre

los niveles de VEGFA e IL17. Por ende, es posible que las funciones de VEGFA sean más complejas de analizar, e involucren el estudio principalmente de las células epiteliales y endoteliales en donde, según los datos de Vannay y col., parece hallarse la mayor expresión de HIF1 α en los pacientes celíacos.

El eje Th17 ha sido estudiado en EC, pero con observaciones contradictorias. En este estudio, encontramos un aumento de las células IL-21⁺, mayormente CD3⁺, en la mucosa duodenal de pacientes ACD. Este aumento está principalmente basado en un incremento de células del compartimiento intraepitelial, aunque cuando se analizaba la relación de células CD3⁺IL-21⁺ dentro de las CD3⁺, se observó que existía un aumento en ambos compartimientos. La diferencia entre estos resultados puede ser debida a la presencia de otras células, como células plasmáticas, productoras de IL-21 en *lamina propria*. Estos resultados, junto con la mayor expresión a nivel genético de esta citoquina confirmar la inducción de IL-21 en los pacientes ACD.

Por otro lado, no observamos diferencias significativas, ni en el nivel de expresión del gen *IL17A*, ni en el número de células IL-17A⁺, entre las muestras de duodeno de los pacientes ACD y NC. El número de las células IL-17A⁺ es menor al observado para las células IL-21⁺. En promedio, en pacientes celíacos, encontramos que solo el 10% de las células T fueron productoras de IL-17A⁺, mientras que un 30-40% producen IL-21. Esta observación indica que no todas las células T IL-21⁺, expresan IL-17A⁺, sugiriendo que el número de células Th17 es inferior al de células T IL-21⁺, resultados que concuerdan con otras publicaciones (Leeuwen *et al.*, 2013). Las diferencias encontradas en las diferentes publicaciones pueden ser debidas a las diferentes estrategias experimentales seguidas en cuando al uso de microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o establecimiento de líneas T derivadas de la mucosa duodenal. Es de destacar que siendo solo el 40% de las células IL-17A⁺ linfocitos T (CD3⁺), indicaría que el restante 60% corresponde a células ILC3 y mastocitos, entre otros menos abundantes. En línea con esto, se ha descrito recientemente, que en EC se encuentra un aumento de mastocitos IL-17A⁺, y que esto correlaciona con la severidad de la enteropatía, sugiriendo un rol de estas células en la patogenia (Frossi *et al.*, 2017). Por lo tanto, el escenario donde podría intervenir IL-17A puede ser consecuencia funcional de una sumatoria de células: Th17, ILC3, mastocitos, y otras con una contribución menor.

No observamos diferencias en la expresión de IL-21 o IL-17A con respecto a la edad y grado de enteropatía, resultado que contrasta con otros estudios (Scaleia *et al.*, 2012). En nuestra evaluación encontramos solo una diferencia significativa en la densidad de células IL-21⁺ en pacientes con enteropatía con respecto a población control. Sin embargo, se debe destacar que aquí se evaluaron pacientes mayoritariamente de menor edad y con enteropatía severa. Estos sesgos de selección de población ocurren habitualmente en este tipo de estudios. La correlación de un determinado parámetro con el grado de enteropatía requiere poblaciones muy numerosas, y que cubran un amplio rango de edades y una distribución homogénea de casos para los distintos grados de enteropatía, protocolos que son complejos de desarrollar. En conclusión, necesitaríamos incluir pacientes con una mayor variedad de enteropatías y edades más adultas que resultan ser menos frecuentes en la población de muestras que normalmente ingresan a estos protocolos de estudio.

También evaluamos el nivel de expresión de genes frecuentemente asociados con la vía de IL-17, en especial destacamos a *IL23A* y de *IL22*. Para *IL23A* observamos un aumento de expresión en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos activos. Esto se podría relacionar con la observación que células de sangre periférica (PBMCs) de pacientes celíacos estimuladas con PT-Gliadinas presentaron un incremento de IL-23A (Harris,

Fasano and Mann, 2008). También encontramos aumento de expresión del gen *IL22*, lo que contrasta con publicaciones que no encontraron un aumento de células T productoras de IL-22 en *lamina propria* (Monteleone *et al.*, 2010), u otros artículos donde se describe la incapacidad de producir IL-22 por células T CD4⁺ derivadas de pacientes celíacos activos frente a una estimulación con péptidos derivados de gluten (Bodd *et al.*, 2010). Sin embargo, en esos estudios se evaluó exclusivamente la producción de IL-22 por linfocitos T, mientras que existen distintas fuentes de producción de esta citoquina en la mucosa como ILC-3, NK, y linfocitos intraepiteliales, que no fueron evaluadas (Sabat, Ouyang and Wolk, 2014; Keir *et al.*, 2020).

La IL-22 es inducida por IL-23A y HIF1 α en células T CD4⁺ (Budda *et al.*, 2016) y células T CD8⁺ (Witte *et al.*, 2010). Si bien, esta citoquina tiene funciones críticas en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial, no es claro cuál sería su rol en EC. La IL-22 promueve la capacidad del IFN γ para inducir enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Bansal *et al.*, 2013). Esto es interesante, ya que, de esta forma, IL-22 podría contribuir con los niveles elevados de marcadores de oxidación encontrados en suero y en mucosa duodenal de pacientes celíacos (Stojiljković *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2018; Maluf *et al.*, 2020). Por otra parte, en las células epiteliales, IL-22 tiene un rol protector, al incrementar la integridad del epitelio, promoviendo la proliferación de los enterocitos, y la producción de mucus y péptidos antimicrobianos (Arshad *et al.*, 2020). Si bien estas funciones resultan beneficiosas en el epitelio intestinal, debemos considerar que en presencia de IFNs, la IL-22 induce respuestas pro-inflamatorias. En particular, la presencia de los IFNs tipo I inducen un cambio en la señalización intracelular por IL-22 promoviendo la activación del factor STAT1 por sobre STAT3, lo que causa la expresión de quimoquinas proinflamatorias (CXCL10, CXCL11), que casualmente se encuentran aumentadas en EC (Mühl, 2013; Bondar *et al.*, 2014). Por ende, estas observaciones sugieren que IL-22 podría tener múltiples roles en la patogenia de la EC.

La IL-10, que encontramos incrementada en EC, es otro factor relevante en la respuesta de la mucosa intestinal. Siendo una citoquina regulatoria es común encontrarla elevada en situaciones fuertemente inflamatorias. A pesar de ello, debemos considerar que el contexto local condiciona la funcionalidad de esta citoquina sobre el complejo receptor de IL-10 (IL-10RA/B). De este modo, en forma análoga a IL-22, células mieloides estimuladas con IL-10 en presencia de IFN α , no tienen una señalización intracelular dominada por STAT3, sino por STAT1, lo que conduce a la inducción de quimoquinas proinflamatorias (Mühl, 2013). Por lo tanto, la sola expresión de este factor no debe interpretarse necesariamente con la presencia de una respuesta reguladora eficaz.

El análisis de PCA indicó la existencia de comportamientos dispersos en la expresión de los factores asociados a la EC. Este fenómeno, puede estar relacionado con la necesidad de incrementar el número de pacientes estudiados, como también en la posible presencia de otras variables no estudiadas. Entre estas últimas, la variabilidad en la cantidad y el tiempo de consumo de gluten es uno de los factores más importantes si consideramos la posibilidad de que los genes estudiados presenten cinéticas de expresión diferentes. Para el caso concreto de IL17A, ciertas publicaciones recomiendan la evaluación en células, o tejidos, recientemente estimulados (Ramírez-sánchez *et al.*, 2020). Asimismo, debemos tener en cuenta que la expresión de algunas citoquinas es controlada por factores que dependen de la microbiota, y también de la dieta. Como hemos comentado en la introducción general, los pacientes celíacos activos presentan importantes modificaciones en la microbiota. Por lo tanto, se deben considerar estos factores a la hora de asociar la

expresión de estas citoquinas, y sus biomarcadores, con subgrupos de pacientes ACD. A pesar de ello, debemos mencionar que dichos estudios integrales, son extremadamente difíciles de realizar y escapan a las posibilidades técnicas de nuestro estudio.

Por lo analizado, es claro que la respuesta inflamatoria en EC es influida por una serie de citoquinas inflamatorias, entre ellas los IFNs, tanto tipo I, II y de tipo III, así como por IL-10, IL-21, IL-22, IL-23, que se encuentran incrementadas en la mucosa duodenal de los pacientes ACD. De esta forma, consideramos que los IFNs son moduladores de la actividad de estas citoquinas promoviendo su función inflamatoria. A su vez, ciertas citoquinas como IL-21 e IL-23A pueden potenciar la respuesta inducida por los IFNs. Esto se debe a la capacidad de IL-21 para estimular la producción de anticuerpos, y de linfocitos T, entre ellos citotóxicos, los cuales promueven la producción de IFNs, e inducen vías de muerte celular programada. Al mismo tiempo, IL-23A es capaz de inducir poblaciones inflamatorias como células ILC3, Th17, Th22 y T CD8⁺IL-22⁺. Lo mismo ocurre para HIF1 α en la promoción de daño al epitelio y macrófagos expuestos a IFN γ . Adicionalmente, los IFNs son capaces de inducir directamente vías de muerte celular, tanto por mecanismos apoptóticos, como por necroptosis, ferroptosis y piroptosis; y con ello liberar diferentes tipos de alarminas promoviendo la respuesta inflamatoria local (Sarhan *et al.*, 2018; Perez *et al.*, 2021). Como se describe en los otros capítulos de esta Tesis, las alarminas y el eje TAM, son modulados por IFNs o proteínas controladas por éstos, razón por la cual, los estudios sobre el rol funcional de los diferentes IFNs en la patogenia de EC deben ser profundizados.

5.10 Conclusiones

Las tres familias de IFNs se encuentran inducidas en la enfermedad celíaca activa. Al mismo tiempo, diferentes biomarcadores de los IFNs (MX1, IRF1, SOCS1, USP18) se encuentran inducidos en duodeno de los pacientes celíacos. Por lo tanto, existe una asociación entre las tres vías de IFNs y la EC. Sin embargo, futuros trabajos sobre estas vías, en particular la vía de IFNs tipo III, serán necesarios para poder comprender el rol de estos mediadores en el desarrollo y progresión de la EC.

El nivel de expresión del gen *HIF1A* está aumentado, juntamente con un incremento de IFN γ e IRF1, en los pacientes celíacos activos. Dicha correlación puede asociarse con el control de la expresión de este factor por el IFN γ .

Los pacientes celíacos activos expresan mayores niveles del ARNm de IL-10. Sin embargo, dada la falta de correlación entre este factor y las demás vías estudiadas, no podemos concluir que dicha expresión refleje actividad regulatoria de IL-10.

El número de células productoras de IL-21, pero no de IL-17A está aumentado en la mucosa duodenal con enteropatía celíaca. Las células T son prácticamente las únicas que expresan la IL-21, mientras que un 40% de las células productoras de IL-17A son linfocitos T, dejando un aproximado del 60% de las células IL-17A⁺ como fuentes potenciales a células ILC3 y/o mastocitos, pero no células plasmáticas.

La expresión de los genes *IL22* e *IL23A* está aumentada en los pacientes celíacos no tratados. A su vez, la ausencia de correlación entre *IL22*, *IL23*, e *IL21*, con *IL17A*, sugiere que la inducción de estas citoquinas es ocasionada por fenómenos diferentes o, alternativamente, ocurra en células diferentes. Las correlaciones entre estos factores y biomarcadores de la vía de IFNs indicaría una posible interacción entre ambas vías en la patogenia de la EC.

No se encontraron clústeres definidos en el estudio de asociación de los marcadores de la vía de IFNs, con la vía IL17A/IL21. Esto se debe a la heterogeneidad en la expresión de dichos factores dentro de la población celíaca. Por lo tanto, este tipo de análisis requeriría el estudio de un gran número de pacientes, y con informaron detallada sobre factores ambientales y genéticos en esa población.

La vía de los IFNs es dominante en los pacientes celíacos no tratados, y potencialmente puede modular otras vías asociadas con la EC. Entre estas, se encuentran las vías de muerte celular, y estrés inflamatorio local, junto con la modulación de la actividad y expresión de citoquinas como IL-10, IL-21, IL-22 e IL-23A.

6 Parte C: Análisis de la expresión del sistema “TAM” en mucosa duodenal

6.1 Introducción general al Sistema “TAM”

El sistema de receptores tirosina quinasa (RTKs) denominado “TAM” está conformado por tres receptores, Tyros3, Axl y MerTK y sus ligandos Gas6 (growth arrest factor specific 6) y Pros1 (Proteína-S). Estructuralmente estos receptores comparten características con otros RTKs, como el receptor de insulina (Rothlin *et al.*, 2015). Sin embargo, ciertos rasgos particulares como una secuencia conservada “KWIAIES” en la cola citoplasmática y otras características estructurales determinan su clasificación independiente (Rothlin *et al.*, 2015). Los TAMs se encuentran en diversas células como células dendríticas, macrófagos, NK, linfocitos T y B, microglía, entre otras (Rothlin *et al.*, 2015; Fourgeaud *et al.*, 2016; Peeters, Rahbech and thor Straten, 2020) donde participa en diferentes funciones que pueden ser agrupadas según:

1. Control de la respuesta inmune adaptativa.
2. Control de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos.
3. Control de la reparación del heridas.
4. Control de la proliferación celular.
5. Control de la respuesta innata y homeostasis con microbiota.

Estas funciones requieren la interacción entre los ligandos de los TAMs, a partir de lo cual se genera una vía intracelular iniciada con la fosforilación de residuos de Tyr en dominios similares a los ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) presentes en los TAM. Esto permite el reclutamiento de fosfatasas, como la SHP-1, que inhiben la respuesta de factores de las vías: NF- κ B, JAK-STAT y IL-1/TLRs (Rothlin *et al.*, 2015).

Los receptores TAM pueden ser enzimáticamente cortados por diferentes proteasas tisulares y de membrana, como la ADAM10 y metaloproteasas. De este modo, las versiones solubles de los TAM (sTyros3, sMerTK y sAXL), compiten con los receptores de membrana por sus ligandos solubles (Ekman, Stenhoff and Dahlbäck, 2010; Wu *et al.*, 2011). Ambos ligandos también son capaces de unirse y ser transportados en circulación por la proteína de unión al complejo 4b (C4BP), interacción que compite por la unión a los TAM en membrana (Rothlin *et al.*, 2015).

Los ligandos, Pros1 y Gas6, presentan una gran similitud estructural (~40% de homología), tienen masas moleculares cercanas a los 75 kD, y son modificadas post-traduccionalmente por un mecanismo dependiente de la vitamina K, que incorpora un dominio carboxílico (dominio “GLA”). Este dominio le permite unirse al Ca^{2+} libre (Rothlin *et al.*, 2015) que es crítico para las funciones de este eje, como la capacidad de unirse a residuos de fosfatidilserina (PtdSer) expuestos en la membrana externa de células, plaquetas activadas o cuerpos apoptóticos. En estas condiciones, el Ca^{2+} se une a las cargas negativas de la PtdSer y aumenta la afinidad de los ligandos TAM con sus receptores (Rothlin *et al.*, 2015).

Es necesario destacar que los ligandos tienen diferentes afinidades por los receptores. Gas6 es el único ligando capaz de unirse a los tres receptores, con afinidad decreciente para Axl, Tyros3 y MerTK (Rothlin *et al.*, 2015). En cambio, Pros1 solo se une a los dos últimos. Por otra parte, Pros1 es muy importante en la homeostasis vascular, de forma independiente de los TAMs. Esta función radica en la capacidad de unirse a la proteína-C activada (aPC) actuando como un cofactor no enzimático. Este complejo aPC-PS es fundamental durante la formación del coágulo, debido a que degrada los factores procoagulantes V y VIII, y esto evita la formación excesiva de trombina, controlando la

zona donde se forma el coágulo (Rothlin *et al.*, 2015). Otra de las diferencias entre los ligandos, es la presencia de versiones de corte y empalme para Gas6. En concreto, se conoce al Gas6SV, que presenta una inserción de 43 aminoácidos que contiene un sitio de corte por proteasas. De esta forma, diferentes proteasas liberan un fragmento de Gas6SV de 50 kD al medio extracelular que tiene capacidad para unirse a los receptores TAM y activarlos (Goruppi *et al.*, 1997).

Los ligandos del sistema TAM se producen a nivel local como sistémico. Para esto participan células epiteliales, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T activadas fibroblastos, células endoteliales y de músculo liso vascular (Benzakour and Kanthou, 2000; Rothlin *et al.*, 2015). Mientras que los hepatocitos son productores de la mayor parte de la Pros1 circulante en sangre (Hall, Peake and Winship, 2006).

En las siguientes secciones se discutirán las diferentes funciones del sistema TAM por separado.

6.2 El sistema TAM como controlador de la respuesta adaptativa

6.2.1 Regulador tardío de la activación de células T en órganos linfoides secundarios (OLS)

Mediante experimentos con animales knockouts (KO) para los diferentes receptores TAM o combinaciones de estos, se comprobó que su ausencia genera un fenotipo auto-inflamatorio, con presencia de hipertrofia en los órganos linfoides secundarios, y anticuerpos anti-ADN, anti-colágeno y anti-fosfolípidos, sumado a mayor sensibilidad a shock endotóxicos por LPS (Lu and Lemke, 2001). La hipertrofia de los órganos linfoides secundarios se relacionó con un mayor número de linfocitos T y B, sugiriendo que el eje TAM es importante en el control de la expansión clonal y activación de estas células. Posteriormente, se confirmó que las células dendríticas sobreexpresan estos receptores en membrana al activarse por medio de la señal de diferentes TLRs (TLR3, 4 y 5) (Rothlin *et al.*, 2007), y que, a su vez, estos inducirían a los IFNs tipo I, quienes incrementan la síntesis de los receptores TAM. Esta inducción se acompaña también la producción de Pros1 por células T recientemente activadas (Carrera Silva *et al.*, 2013). De esta forma, en la interacción célula T-célula dendrítica, los receptores TAM tienen un rol moduladora de la activación celular. Los linfocitos T activados expresan Pros1 en su membrana en forma de “parches” con PtdSer. Estas zonas con Pros1 pueden interactuar con las células dendríticas que expresan TAM, los cuales activan su fosforilación intracelular y al mismo tiempo, interaccionan con el receptor de IFN I (IFNAR). Esta interacción modifica la señal intracelular de este receptor, lo que conduce a un aumento de las proteínas SOCS1 y -3, las cuales inhiben la transducción de señales por diferentes vías proinflamatorias (Carrera Silva *et al.*, 2013). En parte, SOCS1/3 inhiben las vías JAK/STAT al unirse a las proteínas JAKs activadas e impiden la fosforilación de otras proteínas, mientras que reclutan E3 ubiquitina-ligasas que inician el proceso de proteólisis de factores relevantes de las vías de señalización de los receptores TLRs e IL-1R, como NF- κ B y JAK/STAT (Tamiya *et al.*, 2011). De esta forma, la señalización conjunta de los TAM y de IFNs tipo I, reduce la señal de secreción de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, la señalización intracelular de los TAM induce la expresión del factor “twist”, que inhibe la producción de TNF α (Sharif *et al.*, 2006). Este mecanismo, es de aparición tardía en la activación de las células T y sirve para limitar la proliferación y activación excesiva de las células T, e indirectamente de los linfocitos B (Rothlin *et al.*, 2015).

6.2.2 Regulador de las células adaptativas T y B efectoras

Los receptores TAM son expresados en la membrana de las células T efectoras ya diferenciadas. Por ejemplo, el receptor MerTK se encontró en poblaciones de células T CD4⁺ o CD8⁺ activadas, y en estas últimas, funciona como un correceptor activador (Cabezón *et al.*, 2015; Peeters *et al.*, 2019). Los receptores Axl y MerTK se expresan en algunas células Treg (CD4⁺CD25⁺), siendo el ligando Gas6 capaz de estimular el fenotipo supresor aumentando la expresión de FoxP3 y CTLA4 (Zhao *et al.*, 2017).

Por su lado, Axl participa en respuestas a agentes virales, en particular por estimulación de la presentación cruzada en las células dendríticas para la activación de las células T CD8⁺. La presentación cruzada se encontró estimulada en presencia de un complejo conformado por Axl y las proteínas LRP1 y RANBP9 que promueven la esferocitosis de cuerpos apoptóticos (Subramanian *et al.*, 2014). A su vez, los animales deficientes en Axl son más susceptibles a infecciones virales. Las células dendríticas CD11c⁺ de los animales Axl-KO son incapaces de inducir un fenotipo pro-Th1 en células T CD4⁺ y CD8⁺, con menor producción de IFN γ (Schmid *et al.*, 2016). Este rol de Axl, como promotor de un perfil Th1, se observó en un modelo murino de hipertensión por administración de acetato de deoxycorticosterona, donde se comprobó que la ausencia de este receptor en células T disminuye el daño causado por la respuesta inmune con menor producción de IFN γ (Batchu *et al.*, 2016). En conjunto, estas observaciones indican que los receptores Axl y MerTK presentan un rol en la activación, proliferación y supervivencia de linfocitos T. La información sobre el rol de Tyro3 es más limitada. Al mismo tiempo, se desconocen los efectos de los receptores TAM en otras poblaciones de linfocitos T, como los linfocitos T γ/δ o linfocitos T CD4⁺ Th17 o Th2.

En el caso de linfocitos B, solo hay pocos estudios sobre MerTK, que muestran que su inhibición afecta negativamente a la capacidad de presentar antígenos y producir anticuerpos (Shao, Eisenberg and Cohen, 2008; Shao *et al.*, 2014). Por su lado, Tyro3 y Axl, solo han sido observados en células procedentes de leucemias crónicas tipo B (Sinha *et al.*, 2015). En todos los casos, los receptores TAM parecen conferir señales anti-apoptóticas a estas células (Peeters, Rahbech and thor Straten, 2020).

6.3 El rol sistema TAM en la remoción de los cuerpos apoptóticos

Empleando un modelo de inflamación intestinal por dextrán sulfato de sodio (DSS), en ratones deficientes en los receptores TAM, se observó acumulación de cuerpos apoptóticos en los tejidos inflamados. Las células infiltrantes, neutrófilos, morían por apoptosis, pero no eran removidos eficientemente (Bosurgi *et al.*, 2013). Investigaciones posteriores, confirmaron que los receptores TAM, en conjunto con la proteína TIM-4 y la integrina $\alpha\beta 5$, se encargan de la detección y remoción de los cuerpos apoptóticos por interacción con residuos de PtdSer en la membrana externa. En la apoptosis se activan flipasas (ej.: P4-ATPasa) y “escramblasas” (ej.: XKR8) en la membrana celular, que generan residuos de fosfolípidos en la membrana externa. La presencia de PtdSer es reconocida por TIM-4, mientras que la integrina $\alpha\beta 5$ se une a estos por medio de la proteína MGF-E8 (Nagata, 2018). Los receptores TAM se unen a los cuerpos apoptóticos por medio de sus ligandos, que interaccionan con PtdSer por sus dominios “Gla”, en presencia de Ca²⁺ (Rothlin *et al.*, 2015). Esta función es principalmente llevada a cabo por macrófagos residentes en diferentes tejidos. De forma tal, que la ausencia de MerTK (el receptor TAM más expresado en estos macrófagos) ocasiona un acúmulo de los cuerpos apoptóticos en tejidos como los testículos, el timo o intestino grueso (Rothlin *et*

al., 2015). Los cuerpos apoptóticos acumulados sufren necrosis secundaria, lo que estimula la producción de autoanticuerpos e inflamación localizada que, en un entorno genético adecuado, conduce a autoinmunidad. Diferentes células fagocíticas, como macrófagos y células dendríticas, utilizan diferentes receptores TAM para lograr la eliminación de los cuerpos apoptóticos (Seitz *et al.*, 2007). El predominio de uno u otro receptor o de la célula fagocítica involucrada en cada tejido, depende básicamente de los niveles de expresión de los receptores que, en última instancia, es controlado por señales generadas a través de TLR o IFNs (Rothlin *et al.*, 2007, 2015; Seitz *et al.*, 2007).

Las vías intracelulares que juegan un rol en este mecanismo son diversas, pero todas involucran la activación por fosforilación de la proteína FAK (“Focal adhesion kinase”), la cual es la encargada de activar al factor Rac-1 (“Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”) (Wu *et al.*, 2005). Este factor, es una proteína GTPasa conocida por su capacidad para modificar el citoesqueleto de los fagocitos, permitiendo la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Wu *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, mediante la remoción de los cuerpos apoptóticos, los receptores TAM son capaces de inducir la inhibición de ciertas vías proinflamatorias, como la vía del NF- κ B (Sen *et al.*, 2007). Se cree que diferentes sitios de fosforilación de la cola citoplasmática de los TAM son activadores de diversas vías intracelulares, de forma tal que la inducción de la fagocitosis es independiente a la inhibición de las vías proinflamatorias (Tibrewal *et al.*, 2008). Este último fenómeno, parece estar a cargo de las vías discutidas en la sección 6.2.1, por medio de SOCS-1/3, y el factor twist.

6.4 El sistema TAM y la reparación de heridas

El sistema TAM, ha sido involucrado en diferentes procesos relacionados con la capacidad de reparar heridas. Particularmente, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos y los mecanismos de regulación de la respuesta inmune discutidos en la sección anterior pueden ser considerados dentro de este grupo de funciones. Adicionalmente, se ha visto que los receptores TAM, son adyuvantes en la respuesta de reparación de heridas con daños vasculares y contribuyen a la formación de nuevos vasos en zonas dañadas o inflamadas.

6.4.1 Agregación plaquetaria

El sistema TAM es adyuvante de la agregación plaquetaria inducida por ADP, por medio de la interacción de receptores TAM activados por Gas6, con la integrina α IIb β 3 promoviendo la fosforilación de la integrina y aumentando la señalización por la PI3K y Akt, con la consecuente aceleración de la agregación (Law *et al.*, 2018).

6.4.2 Angiogénesis

Se conoce que el receptor Axl es crucial para la función endotelial y angiogénesis (Melaragno, Fridell and Berk, 1999; Zuo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017). Este efecto es mediado por una acción directa de Gas6 sobre Axl expresado en las células endoteliales, como también sobre células de músculo liso circundantes, las cuales ayudan a estabilizar la formación de nuevos vasos. Al mismo tiempo, Gas6 es capaz de inducir respuestas de sobrevida (anti-apoptótica) en estas células.

6.4.3 Estabilización de la barrera endotelial

Pros1 (y, probablemente en Gas6), tiene la capacidad de recuperar la permeabilidad selectiva de la barrera endotelial post injuria isquémica. Este mecanismo es dependiente de Tyro3 que, activado por Pros1, es capaz de interactuar y activar al receptor esfingosina 1 fosfato (S1P1), el cual recluta y activa a la proteína Rac-1. Esta proteína reorganiza el citoesqueleto endotelial y asegurar la reducción de la permeabilidad vascular (Zhu *et al.*, 2010).

6.5 El sistema TAM y el control de la proliferación celular:

Una de las características de los TAMs es la modulación de la actividad de otros receptores transmembrana. Entre estos, se destacan las modulaciones positivas del eje TAM sobre receptores que aseguran la supervivencia y proliferación de diferentes tipos celulares. Los receptores que interactúan son: EGFR (tumores mamarios), VEGFR2 (células vasculares), FLT3 (células NK), PDGFR (tumores mamarios), MET (células GnRH⁺). Al mismo tiempo, los TAM son iniciadores de diversas señales intracelulares como Erk1/2, PI3K/Akt, PLC γ e incluso, en algunas células, activan al NF- κ B y/o Bcl2 (factor anti-apoptótico) (Axelrod and Pienta, 2014). Inicialmente, muchas de estas observaciones eran realizadas en tumores y llevó a la idea de considerarlos oncogenes (Rothlin *et al.*, 2015). Actualmente se sabe de su rol en la homeostasis celular y tisular por su participación en la inducción de vías anti-apoptóticas y proliferativas en células endoteliales y músculo liso vascular (Axelrod and Pienta, 2014). Análogamente, en las células “stem cells” o progenitoras del epitelio de pulmón, el receptor Axl es fundamental para estimular la proliferación de células epiteliales. Este mecanismo involucra el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos circulantes por la interacción Gas6, unida a estos restos celulares, y el receptor Axl en las células progenitoras (Fujino *et al.*, 2019).

6.6 El sistema TAM y el control de la respuesta inmune innata y la homeostasis con la microbiota

6.6.1 Regulación de las células innatas

El sistema TAM es capaz de regular la inmunidad innata mediante su acción sobre varias células como células NK, macrófagos y células dendríticas. En especial, aquí se comentará sobre las funciones de este eje en modular respuestas proinflamatorias en tejidos no linfoides.

6.6.1.1 Células dendríticas (DC)

Como ya se ha mencionado Axl y Tyro3 son los receptores que más influyen el comportamiento de las células dendríticas. Por medio de Gas6, Axl es capaz de inducir la activación de la migración a los órganos linfoides. Particularmente, se ha observado que células dendríticas de sitios con inflamación crónica en presencia de IFNs tipo I, tienen mayor resistencia a la apoptosis, y capacidad migratoria, en parte debido a la interacción Gas6/Axl en estas células (Scutera *et al.*, 2009).

6.6.1.2 Macrófagos

Como se comentó, dependiendo del tejido y las condiciones o el estado fisiológico del mismo, el nivel de expresión de los receptores TAM es variable, sin embargo, en condiciones basales, el nivel de expresión de los TAM en macrófagos en una situación basal es dominado por MerTK (Seitz *et al.*, 2007). En cambio, en condiciones

inflamatorias tanto macrófagos M1 o M2 expresan más Axl que MerTK, y en presencia de IFN γ la expresión de MerTK puede disminuir (Zagórska *et al.*, 2014). De esta forma, Axl ocupa un rol compartido con MerTK en los macrófagos, dependiendo del estado inflamatorio del tejido.

6.6.1.3 Células NK

En las células NK, Tyro3 y Axl juegan un rol importante en sus funciones y desarrollo, en especial, controlan su ontogenia en médula ósea a través del receptor FLT3 en células pluripotenciales CD34⁺. De hecho, NK Axl-KO son incapaces de madurar a un fenotipo citotóxico en presencia de IL-15 y de producir IFN γ (Park *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios en tumores han demostrado que la inhibición de los TAM en las células NK genera un fenotipo más citotóxico, proponiendo un rol regulatorio de los TAM en las células NK maduras (Paolino *et al.*, 2014).

6.6.2 Regulación de la homeostasis en la microbiota oral:

Se ha demostrado el rol del eje TAM en el mantenimiento de la homeostasis de las mucosas, en especial, se ha estudiado en la respuesta inmune en la mucosa oral donde se observó la expresión de Pros1 y Gas6. Estos tienen una cinética de expresión diferente, y mientras que Gas6 depende de la activación de MyD88 en la vía TLR, no ocurre lo mismo para Pros1. Al mismo tiempo, se comprobó que la ausencia de Gas6, en animales Gas6-KO, promueve el acúmulo de células Th17 por sobre las Treg en la *lamina propria* oral. Este fenómeno genera un desbalance en la microbiota con presencia de un mayor número de bacterias proinflamatorias anaerobias (Nassar, Tabib, Capucha, Mizraji, Nir, Pevsner-Fischer, *et al.*, 2017). También se observó que la ausencia de Gas6 hace que los animales sean más susceptibles a infecciones con patógenos comunes en la mucosa oral, probablemente por una limitada respuesta tipo 1. Se evidenció un menor ingreso de neutrófilos y monocitos a la *lamina propria* de animales Gas6-KO debido a una reducción de la expresión de proteínas vasculares (VCAM-1, ICAM-1, P-selectina) esenciales para la migración transendotelial de estas células. Además, la ausencia de Gas6 inhibe la producción de CCL19 y CCL21 en los órganos linfoides y vasos linfáticos, quimioquinas esenciales para la migración de las células dendríticas (Nassar *et al.*, 2018).

Por todo esto, Gas6 tiene diferentes roles en la inmunidad de mucosas. Por un lado, es un factor anti-inflamatorio secretado por células epiteliales en respuesta a la microbiota local, pero, por otra parte, es fundamental para la migración de células infiltrantes en la *lamina propria* y en la migración de células dendríticas a los órganos linfoides drenantes. En conjunto, el eje TAM puede tener funciones regulatorias limitando la respuestas proinflamatorias exacerbadas, pero, por otro lado, también favorece una respuesta inmune adaptativa eficaz frente a infecciones.

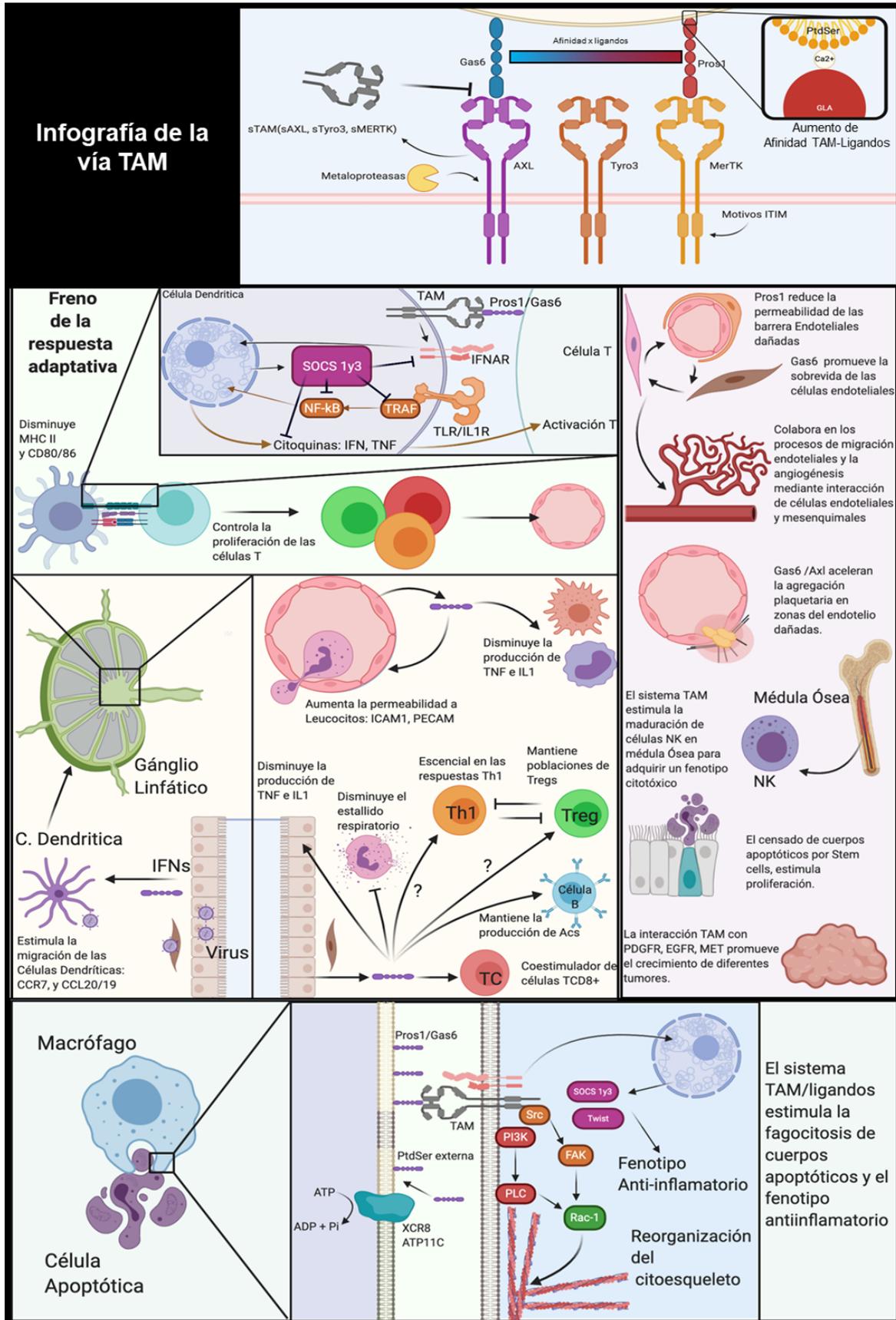


Figura 42-Resumen de la introducción del sistema TAM.

6.7 **Importancia y justificación del estudio del eje TAM en la enfermedad celíaca:**

El eje TAM no fue estudiado en intestino delgado humano, ni en modelos animales. El control de la respuesta inflamatoria, la eliminación de células muertas, la interacción con componentes de la microbiota como moduladores de su función, entre otros, son roles de este eje que hacen que sea interesante su estudio en intestino humano, y en especial en el contexto de una patología inflamatoria crónica como EC, donde se observa:

- Incremento de muerte celular en la *lamina propria* y epitelio (Shalimar *et al.*, 2013) (observaciones no publicadas de nuestro grupo).
- Respuesta inmune adaptativa tipo 1 exacerbada contra péptidos de gliadinas (Nilsen *et al.*, 1998).
- Aumento de los IFNs tipo I (Monteleone *et al.*, 2001).
- Alteración de la microbiota intestinal (Marasco *et al.*, 2016; Lamas *et al.*, 2020).

Estas observaciones, conducen a nuevas preguntas sobre el rol de este eje en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos:

- Incremento de muerte celular.
¿Los macrófagos y células dendríticas locales expresan los receptores TAM? ¿El nivel de expresión de Tyro3, MerTK y Axl en estas células provenientes de pacientes ACD es diferente que en los pacientes no celíacos (NC)?
- Respuesta inmune adaptativa tipo 1 exacerbada contra péptidos de gliadinas.
¿Puede que el nivel de expresión de los ligandos TAM en la mucosa duodenal de los ACD condicione un ambiente proinflamatorio? ¿Las células CD3⁺ expresan algunos de los componentes del sistema TAM? ¿El nivel de expresión de los componentes del sistema TAM es diferente entre ACD y NC?
- Aumento de los IFNs tipo I.
¿Existe correlación entre los niveles en tejido de IFNs tipo I y la expresión del eje TAM?
- Modificación de la microbiota intestinal. *¿Las células epiteliales expresan los componentes TAM? ¿Es diferente la expresión de estas proteínas en los ACD y NC?*

6.8 Objetivos específicos de la parte C

- Caracterizar la expresión de los componentes del eje TAM en la mucosa de intestino delgado humano. En especial, realizar estudios comparativos entre mucosa duodenal de pacientes celíacos activos y controles sanos.
- Evaluar las poblaciones celulares involucradas en este eje y la asociación con la enfermedad celíaca.
- Evaluar la asociación entre los IFNs y el sistema TAM en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos activos.

6.9 Hipótesis de Trabajo de la parte C

En base a los comentado, se elaboraron las siguientes hipótesis experimentales.

- Hipótesis 1: El eje TAM y sus ligandos se expresan en diferentes células de la mucosa duodenal humana.
- Hipótesis 2: La enteropatía celíaca se encuentra asociada con un desbalance en la expresión de las proteínas que componen el eje TAM.
- Hipótesis 3: La diferencia en los niveles de expresión de estos componentes es consecuencia de citoquinas asociadas a la enfermedad celíaca activa.

6.10 Resultados experimentales

6.10.1 Nivel de expresión génica de los ligandos TAM en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos (ACD) y no celíacos (NC)

Los ligandos TAM, Pros1 y Gas6 fueron evaluados por diferentes técnicas. En la **Figura 43 -A** se muestra el nivel de mensajero ARNm relativo para ambos ligandos. Para el caso

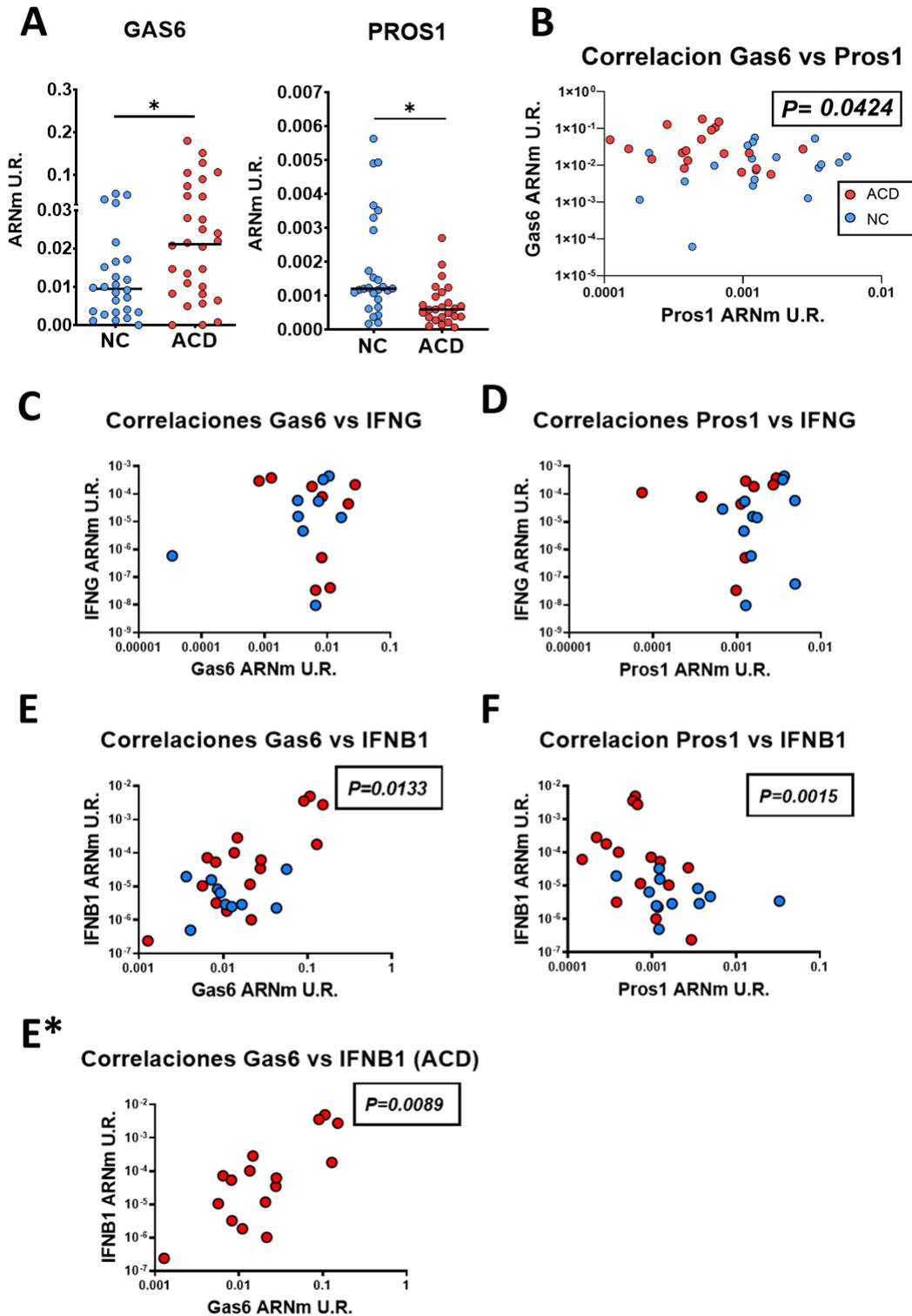


Figura 43- Análisis del nivel de expresión del ARNm de los ligandos TAM en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. **A.-** Nivel relativo de expresión del ARNm de Gas6 (NC: n= 26; ACD: n=30) y Prosl (NC: n=28; ACD: n= 32). En todos los casos el gen *EEF1A1* fue utilizado como gen de referencia. **B.-** Correlación entre niveles relativos de ARNm de los genes *GAS6* y *PROS1* en casos ACD (n= 19) y NC (n=17). **C.-** Correlación entre niveles relativos de ARNm de los genes *IFNG* y *GAS6* en ACD (n= 9) y NC (n=14). **D.-** Correlación entre niveles relativos de ARNm de los genes *IFNG* y *PROS1* en ACD (n= 10) y NC (n=14). **E.-** Correlación entre niveles relativos de ARNm de los genes *IFNB1* y *GAS6* en ACD (n= 16) y NC (n=10). **F.-** Correlación entre niveles relativos de ARNm de los genes *IFNB1* y *PROS1* en ACD (n= 11) y NC (n=12). **E*.-** Correlación entre niveles relativos de ARNm de los genes *IFNB1* y *GAS6* solo para los ACD (n= 16). En el caso de la comparación de los niveles de expresión de Gas6 y Prosl se usó el test de Mann-Whitney debido a que las poblaciones comparadas no presentaron distribuciones normales según test estadísticos. En todos los casos el p-valor es (*) p<0.05; (**) p<0.01. El gráfico de Gas6 y Prosl, muestra los datos individuales de cada paciente, y la barra correspondiente a la mediana. Solo para Gas6 se partió el eje para lograr una mejor visualización de los datos. Para las correlaciones se utilizó el “test de Spearman”, se muestran los valores de p-Valor <0.05.

de Gas6 se encontró un aumento del ARNm en los pacientes ACD, mientras que un patrón opuesto se observó para Prosl. Los niveles de expresión de ambos ligandos presentaron una correlación inversa al considerar tanto la población ACD y NC, pero no si ambas poblaciones eran consideradas por separado (**Figura 43-B**). Por otro lado, los niveles de expresión de Gas6 correlacionaron positivamente con los del gen *IFNB1*, pero no con *IFNG*. Al mismo tiempo, la correlación fue más significativa si se consideraba solamente la población ACD. Estos resultados sugieren una influencia de IFN β sobre la expresión de Gas6 en la mucosa duodenal, en particular en pacientes celíacos activos. En cambio, Prosl presentó una correlación negativa con los niveles de los transcritos del gen *IFNB1* considerando la población total ACD y NC, pero no en forma separada. Es así, que los ligandos TAM pueden ser modulados por los IFNs tipo I.

6.10.2 Control de la expresión de los ligandos TAM en un modelo endotelial

Debido a que encontramos una relación a nivel transcripcional entre los ligandos TAM y los IFNs tipo I, decidimos estudiar si los IFNs, ya sea tipo I o II, pueden modular la expresión de los ligandos en una célula de línea, células HMEC-1, como modelo experimental de células endoteliales de microvasculatura, que expresan los ligandos TAM y algunos de sus receptores (Lee *et al.*, 2014). Como se muestra en la **Figura 44**, ninguno de los dos tipos de IFNs pudo modificar la expresión de los ligandos en este modelo de células. Si bien, se observó una tendencia, como un incremento de Prosl en algunos cultivos de HMEC-1 tratados con IFN γ a las 6 y 24hs post estímulo, y con IFN β 1 para Gas6 a las 24 hs, no representó un comportamiento uniforme entre los ensayos, probablemente debido a la dificultad de homogeneizar el cultivo de estas células.

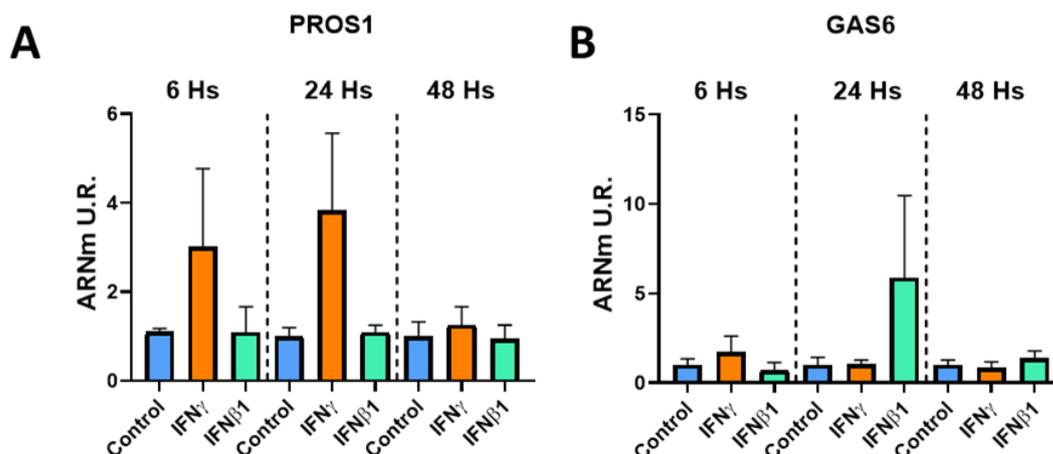


Figura 44- Análisis de la modulación de la expresión de los genes *PROS1* y *GAS6* por IFNs tipo I y II en células HMEC-1. Resultados de los análisis de expresión de *PROS1* (A) o *GAS6* (B) en células de microvasculatura HMEC-1. Los resultados se muestran normalizados contra los controles no estimulados para cada tiempo. Se utilizó el gen *EEF1A1* como gen de referencia. El número de repeticiones del ensayo fue para las 6 hs n= 3, 24 hs n= 6 y 48 hs n=6. Las repeticiones se realizaron en dos experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron dentro de cada tiempo de estimulación por el test de ANOVA post corrección de Dunnet. En el experimento se utilizó una concentración de IFN β 1 de 1000U/mL y 10 ng/ml de IFN γ .

6.10.3 Nivel de expresión de los ligandos TAM en la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos (ACD) y no celíacos (NC):

Los niveles de expresión de estos ligandos fueron estudiados mediante la técnica de western blot (**Figura 45**). Se observó una disminución significativa de los niveles de Pros1 en los pacientes ACD, mientras que Gas6 y Gas6SV (de 75 y 80 kDa, respectivamente), no pudieron diferenciarse por esta técnica y se evaluaron como una única banda cercana a los 75 kDa, la cual se encontró aumentada en los pacientes ACD. La versión alternativa del gen *GAS6*, Gas6SV clivada (50 kDa) no mostró diferencias entre la población ACD y NC. La relación entre las bandas de 50 y 75 kDa, mostró un aumento relativo de la banda de mayor masa molecular en los pacientes ACD. Por otro lado, no se observó una correlación entre los ligandos Pros1 y Gas6, pero si una tendencia semejante a lo hallado en el análisis de RT-qPCR, resultado que podría explicarse por el bajo "n" de este estudio.

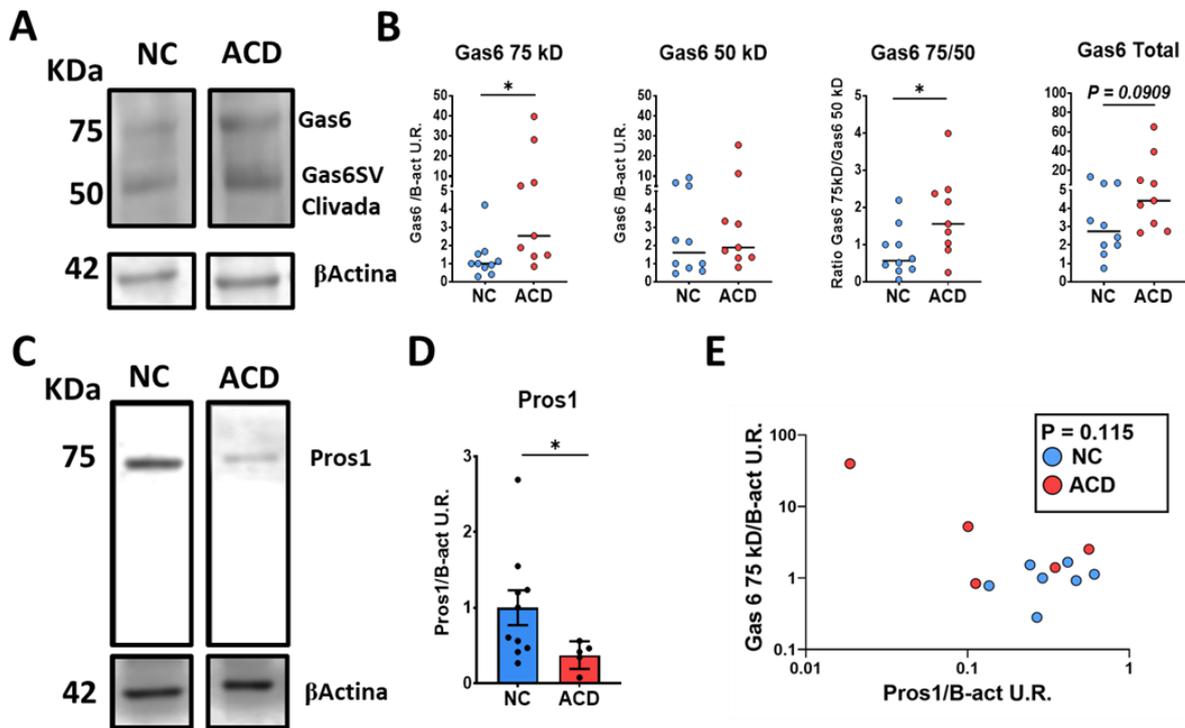


Figura 45- Análisis por western blot del nivel de expresión de los ligandos TAM en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. A. y C.- Imágenes representativas del análisis por western blot de Gas6 y Pros1 respectivamente, para pacientes celíacos activos y no celíacos. En todos los casos beta actina (B-act) fue utilizada como control interno de carga. En el caso de Gas6, la distribución de los datos fueron no normales y se representaron los datos con la mediana. Mientras que los resultados para Pros1 tuvieron una distribución normal, y se representaron en gráficos de barra más el SEM. B.- Análisis de la intensidad de banda para las bandas de 75 kDa, 50 kDa la suma total de ambas bandas (Gas6 Total) y además se muestra la relación de ambas bandas (Gas6 75/50) para pacientes NC (n=10) y ACD (n=9). D.-Análisis de la intensidad de la banda de 75 kDa correspondiente a la Pros1 relativo a beta actina para la población de pacientes NC(n=10) y ACD (n= 5). E.- Correlación de Pros1 y Gas6 (75 kDa) para NC (n=7) y ACD (n=5). Los análisis estadísticos de las comparaciones ACD y NC para las diferentes proteínas se realizaron mediante "Test de Student" no pareado para Pros1 y Mann-Whitney para Gas6 (* p<0.05).

Para estudiar las células productoras de estos ligandos, realizamos al análisis por inmunofluorescencia sobre cortes de biopsias duodenales. En la **Figura 46**, se observa que Gas6 se localizó principalmente en el epitelio, aunque también en algunas células dispersas en *lamina propria* con intensidad de marca variable. Se destaca que Gas6 presentó una marca leve en citoplasma con una mayor intensidad de la señal en el núcleo celular. Esta localización no ha sido descrita, y desconocemos la relevancia de esta observación². En la **Figura 46-B**, se observa la mayor expresión de Gas6 en los pacientes celíacos activos tanto en el compartimiento epitelial como en *lamina propria*. De esta forma, el total de la mucosa presenta el mismo patrón de expresión que se observó por western blot y en el nivel de ARNm del gen *Gas6* por RT-qPCR.

² Notamos que solo podíamos evidenciar dicha marca nuclear en muestras ya sea embebidas en parafina, o congeladas al fijarlas con acetona, o posterior a una recuperación antigénica por calor (Datos no mostrados).

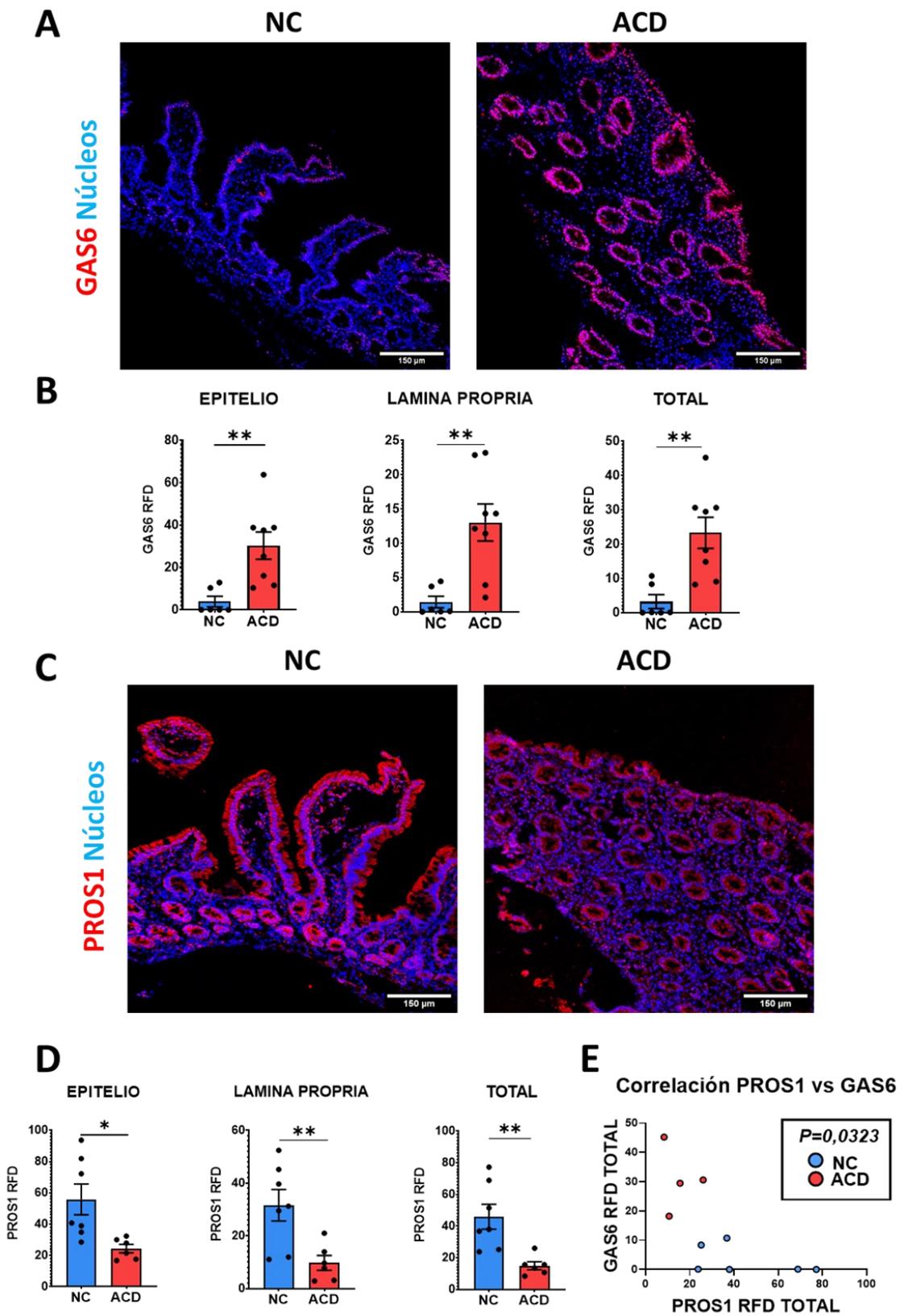


Figura 46- Análisis de la expresión de Gas6 y Pros1 por inmunofluorescencia en secciones de mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. A. y C.- Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia para GAS6 (rojo) o PROS1 (rojo) respectivamente. **B y D.-** Análisis de RFD para Gas6 (ACD n=8; NC n=6) y Pros1 (ACD n=5; NC n=7). Para todos estos casos se utilizó el análisis estadístico de "test de Student" no pareado (* p<0.05; ** p<0.01). Los gráficos muestran las barras con el valor promedio y las barras de error (SEM). **E.-** Se muestra el análisis de correlación entre las RFD de mucosa total para Gas6 y Pros1 (ACD n= 4; NC n= 6). Se utilizó el "test de Pearson" para evaluar posible correlación, se muestra el p-valor obtenido.

El análisis para Pros1 mostró una marca en el compartimiento epitelial, y en algunas células de la *lamina propria* con localización citoplasmática (**Figura 46-C**). El nivel de expresión se encontró disminuido en mucosa total, epitelio y *lamina propria* de los pacientes ACD respecto a los controles (**Figura 46-D**). Estos resultados concuerdan con lo observado por western blot y RT-qPCR. El análisis de correlación entre los niveles individuales de expresión de Pros1 y Gas6 fue significativo (**Figura 46-E**). Esta correlación muestra que ambos ligandos presentan un patrón de expresión diferente entre los pacientes ACD y NC, y al mismo tiempo, sugiere la existencia de un control inverso en la expresión de ambos ligandos TAM en el contexto inflamatorio de la enteropatía celíaca.

6.10.4 Análisis de las diferentes células que expresan Gas6 en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC

La **Figura 47-A** muestra el análisis por inmunofluorescencia realizado con el fin de identificar las poblaciones celulares que expresan Gas6 en la mucosa duodenal. En la *lamina propria*, las células Gas6⁺ son tanto células endoteliales (CD31⁺), como leucocitos (CD45⁺). Particularmente, dentro de las CD45⁺ se encuentran de linfocitos T (CD3⁺), células dendríticas (CD11c⁺) y macrófagos (CD68⁺) que expresan esta proteína. En el epitelio duodenal, en ACD y NC, se observó un gran número de células CD45⁻ Gas6⁺ (enterocitos) y células T CD3⁺ Gas6⁺.

Los recuentos de células Gas6⁺ para los marcadores CD45, CD3, CD68 y CD11c³ se muestran en la **Figura 47-B**. Se observaron tendencias no significativas para los recuentos de células CD45⁻ Gas6⁺ en epitelio (células epiteliales) y CD45⁺ Gas6⁺ en epitelio y *lamina propria*. En parte, es posible que la falta de significancia se deba a la gran dispersión de los resultados entre ambas cohortes de pacientes, y a la existencia de subpoblaciones celulares. Por ello realizamos recuentos de diferentes subpoblaciones de leucocitos. De este modo, encontramos un incremento de células CD3⁺ Gas6⁺ en el epitelio, y de CD68⁺ Gas6⁺ en *lamina propria* de los pacientes ACD. Es de destacar la observación sobre linfocitos T intraepiteliales ya que no se había reportado. En cambio, si se conocía la expresión de Gas6 en macrófagos de diferentes tejidos, y su expresión se asocia con macrófagos residentes capaces de fagocitar cuerpos apoptóticos en situaciones homeostáticas e inflamatorias (Nepal *et al.*, 2019).

Comparando los resultados de los recuentos con los obtenidos por el análisis de RFD, consideremos dos posibles escenarios. El primero es que el incremento en la expresión

³ No se realizaron recuentos de las inmunofluorescencias con doble marcación para CD31 y SMA debido a la dificultad de realizar una identificación segura de todas las células positivas para estos marcadores.

de Gas6 es generalizado en todas las poblaciones estudiadas de células CD3⁺ del epitelio y CD68⁺ de lamina propria. La segunda opción sería que el aumento de Gas6 sea exclusivo de ciertas subpoblaciones de linfocitos T y macrófagos. Nuevos análisis se necesitan para confirmar dichas hipótesis.

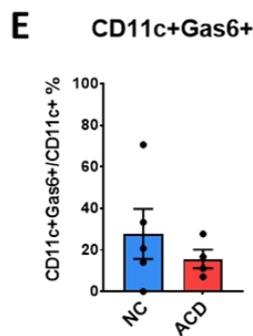
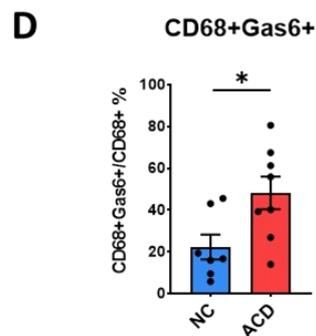
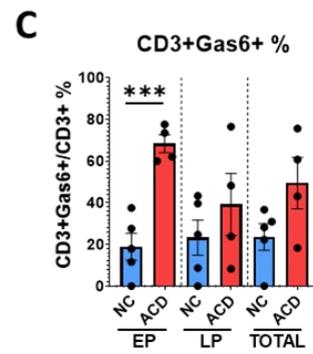
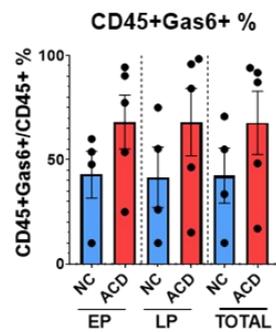
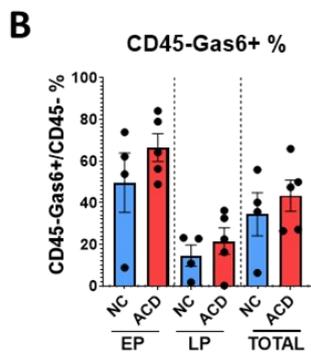
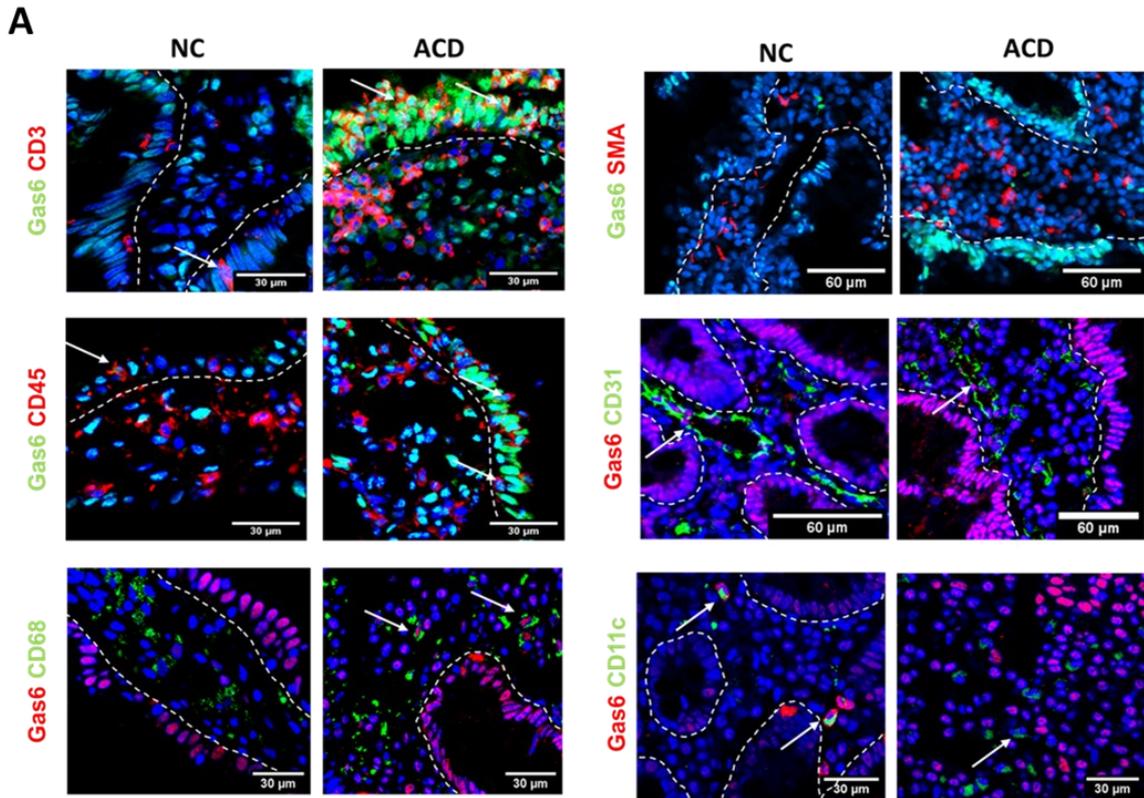


Figura 47- Análisis de las poblaciones celulares Gas6⁺ en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC. **A.-** Imágenes representativas de inmunofluorescencia en secciones de biopsias duodenales para Gas6 y marcadores de linaje: CD45, CD3, CD68, SMA, CD31 y CD11c. Las imágenes fueron obtenidas con aumentos de 630X y 400X final, y sometidas a diferentes magnificaciones digitales, indicando las escalas en las respectivas imágenes. Los límites entre epitelio y *lamina propria* fueron remarcados con líneas blancas discontinuas. Algunas de las células doble positivas se indican con flechas blancas. **B.-** Resultados del análisis de células CD45⁻ Gas6⁺ y CD45⁺ Gas6⁺ (NC n= 4; ACD n=5) en los compartimientos epiteliales (EP), *lamina propria* (LP) y el total de la mucosa duodenal (TOTAL). **C.-** Resultados del análisis de células CD3⁺ Gas6 (NC n= 5; ACD n= 4). **D.-** Resultados del análisis de células CD68⁺ Gas6⁺ en la mucosa duodenal de ambas cohortes de pacientes (NC n =7; ACD n= 8). **E.-** Resultados del análisis de células CD11c⁺ Gas6⁺ en la mucosa duodenal de ambas cohortes de pacientes (NC n =5; ACD n= 4). Los resultados se muestran como valores individuales por paciente ubicados dentro de barras de altura correspondiente a la media de la población más las barras de error sistemático (SEM). En todos los casos, el análisis estadístico fue test de Student no pareado para cada uno de los compartimientos por separado (* es p<0.05, *** es p<0.001). En los ejes de ordenadas se aclara la referencia de normalización para cada uno de los recuentos.

6.10.5 Análisis de las diferentes células que expresan Pros1 en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC

Con el objetivo de identificar las poblaciones de células T (CD3⁺) y dendríticas (CD11c⁺) que expresaran Pros1 se realizó un estudio por inmunofluorescencia⁴ (**Figura 48-A**). Tanto la mucosa duodenal de pacientes celíacos activos como controles no celíacos presentan poblaciones de células T y células dendríticas que expresan Pros1 en su citosol. En ambos casos, las células estuvieron dispersas en la mucosa intestinal, y la marca fue más débil que en las células epiteliales. A su vez, los recuentos manuales de dichas poblaciones solo mostraron tendencias a una menor cantidad de ambas poblaciones Pros1⁺ en los pacientes ACD. Una posible explicación es que esta llamativa tendencia puede deberse a la existencia de subpoblaciones de células con expresión reducida de la Pros1. Sin embargo, se requiere de nuevos ensayos con marcadores específicos de subpoblaciones de células T y células dendríticas para poder confirmarlo.

⁴ Para el análisis de Pros1 no se realizaron recuentos de células leucocitos totales (CD45⁺) o enterocitos debido a la incompatibilidad de los anticuerpos utilizados. Futuros ensayos con reactivos compatibles serán necesarios para el estudio de dichas poblaciones celulares.

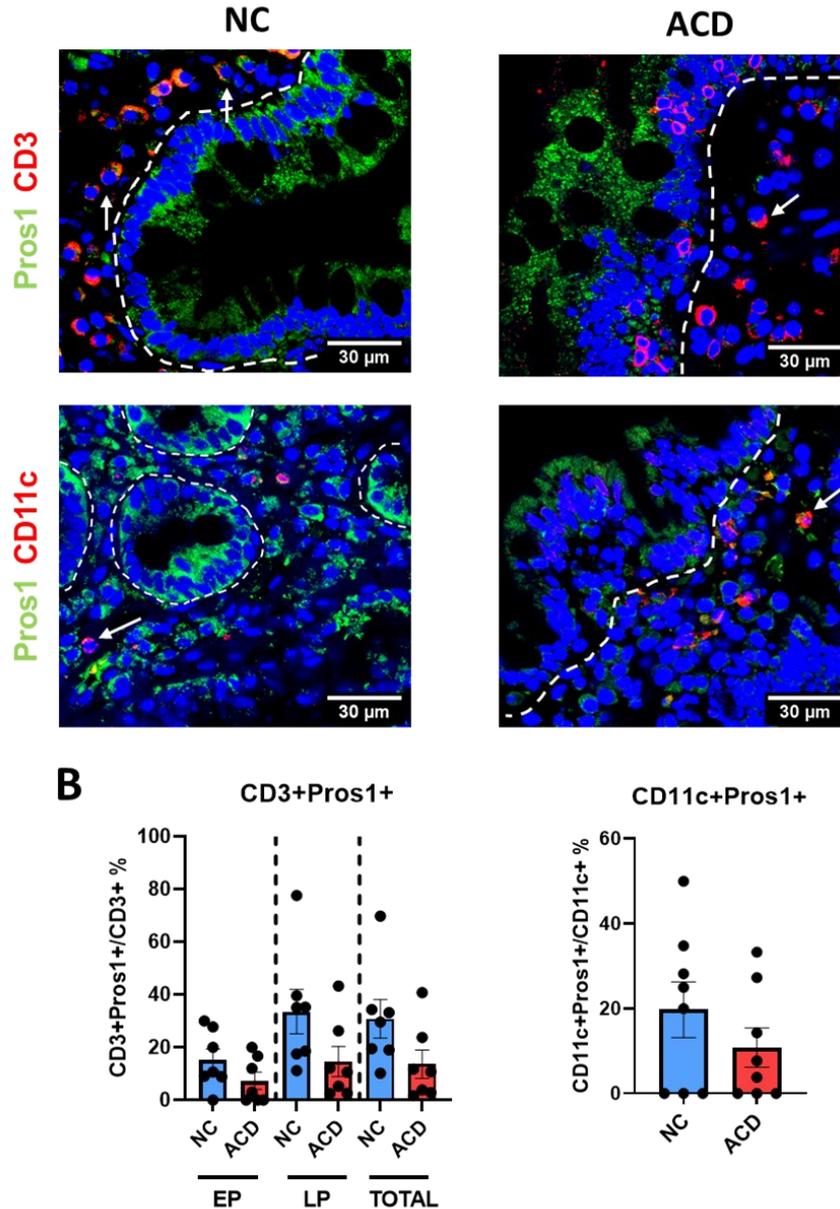


Figura 48- Análisis de la expresión de Proteína S en células T y células dendríticas. A.- Imágenes representativas para Pros1 en verde, y marcadores de linaje CD3 y CD11c en rojo. Las imágenes fueron obtenidas con aumentos de 630X final y sometidas a diferentes magnificaciones digitales, indicando las escalas en las respectivas imágenes. Los límites entre epitelio y *lamina propria* fueron remarcados con líneas blancas discontinuas. Algunas de las células doble positivas se indican con flechas blancas. **B.-** Resultados del análisis de las células CD3⁺Pros1⁺ en los compartimientos epiteliales (EP), *lamina propria* (LP) y el total de la mucosa duodenal (TOTAL), y recuentos de células CD11c⁺Pros1⁺ en toda la mucosa. Los resultados se muestran como valores individuales por paciente ubicados dentro de barras de altura correspondiente a la media de la población, más las barras de error sistemático (SEM). El análisis estadístico fue test de Student no pareado para cada uno de los compartimientos por separado. En los ejes de ordenadas se aclara la referencia de normalización para cada uno de los recuentos.

6.10.6 Estudio de la expresión genética de los receptores TAM en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC

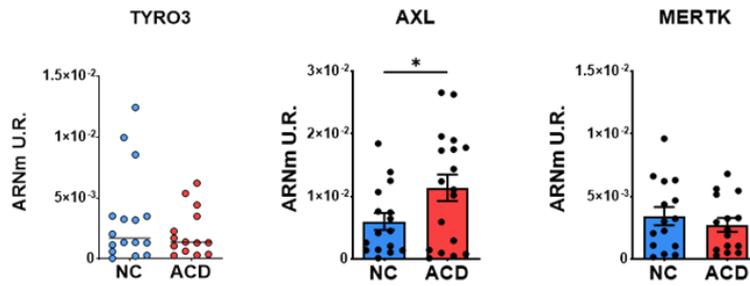
La **Figura 49** muestra los resultados del análisis de la expresión de los diferentes receptores TAM en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC. Los tres receptores se expresan en la mucosa duodenal, aunque se observa un leve aumento del nivel de expresión del gen *AXL* en los pacientes celíacos activos. Los otros receptores no presentaron diferencias significativas entre ambas poblaciones.

Con el objetivo de analizar patrones de expresión del sistema TAM, sus ligandos y la vía de IFNs, realizamos un análisis de componentes principales (PCA). De forma análoga a lo comentado en la Parte B, se recurrió a la imputación de datos faltantes por medio del uso del paquete missMDA.

El análisis por PCA mostró que, para las primeras dos dimensiones, existe una buena separación entre población de pacientes ACD y NC en la dimensión 2 (**Figura 49-B**). Además, dentro del grupo de pacientes ACD, se observa la asociación, ya comentada, entre *GAS6* e *IFNB1*. El análisis también sugiere una asociación entre pacientes que expresan altos niveles de *GAS6*, *IRF1* e *IFNG*, que se muestra como un subgrupo independiente de pacientes celíacos en el gráfico de clústeres (**Figura 49-D**). En concordancia con los datos de RT-qPCR, se observa una asociación inversa entre las variables *PROS1* y *GAS6*. Finalmente, este análisis sugiere una asociación en los tres receptores TAM entre sí, y biomarcadores de la vía de IFN tipo I, como *USP18* y *SOCS1*, *SOCS3* e *IRF8*. Esto último se puede relacionar con la biología del sistema TAM, ya que en presencia de IFNs su señalización induce la expresión de *SOCS1* y *-3* (Rothlin *et al.*, 2015). De esta forma, se pudieron obtener 2 clústeres para la población celíaca activa según el nivel de expresión de *GAS6*, *IFNB1*, *IFNG*, *IRF1*, los tres TAM, *SOCS1* y *USP18*. Esta asociación no parece depender del grado de enteropatía, ni edad de los pacientes. A su vez, estos resultados indican la posible regulación de los IFNs y factores asociados, en la vía TAM en los pacientes celíacos no tratados.

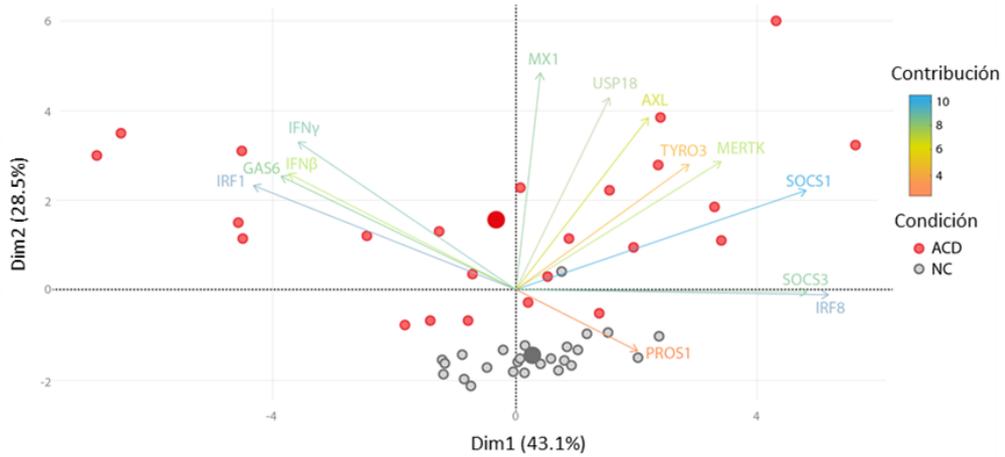
Figura 49- Análisis semi cuantitativo del nivel ARNm de los receptores TAM en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC. A.- Niveles de ARNm de los genes *TYRO3* (ACD n=17; NC n=16), *AXL* (ACD n= 18; NC n=16), *MERTK* (ACD n= 15; NC n=15). En todos los casos el nivel de expresión del gen *EEF1A1* fue utilizado como control o “housekeeping”. Los gráficos para *AXL* y *MERTK* muestran las barras con el valor promedio y las barras de error (SEM), el gráfico de *TYRO3* muestran los valores por pacientes y la barra horizontal correspondiente a la mediana. Para *AXL* y *MERTK* se utilizó el análisis estadístico de “test de Student” no pareado (* p<0.05) y para *TYRO3* se utilizó el test de Mann-Whitney. **B.-** Gráfico de las dimensiones 1 y 2 del PCA. La altura y color de las fechas depende de la contribución porcentual de las mismas a cada dimensión graficada. Los pacientes NC (n= 26) se muestran en gris y los ACD (n = 24) en rojo. **C.-** Contribución porcentual de las variables más importantes a cada una de las dos primeras dimensiones. **D-** Gráfico de subgrupos o clústeres de pacientes (alfa:0.90).

A

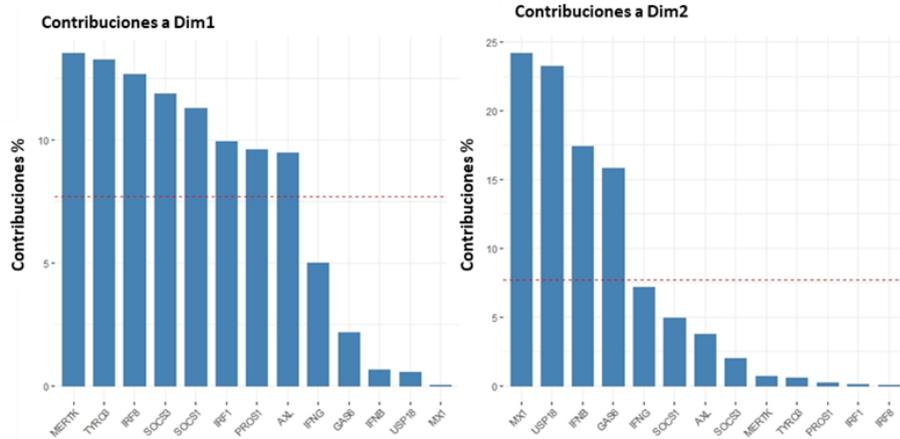


B

Análisis de componentes principales

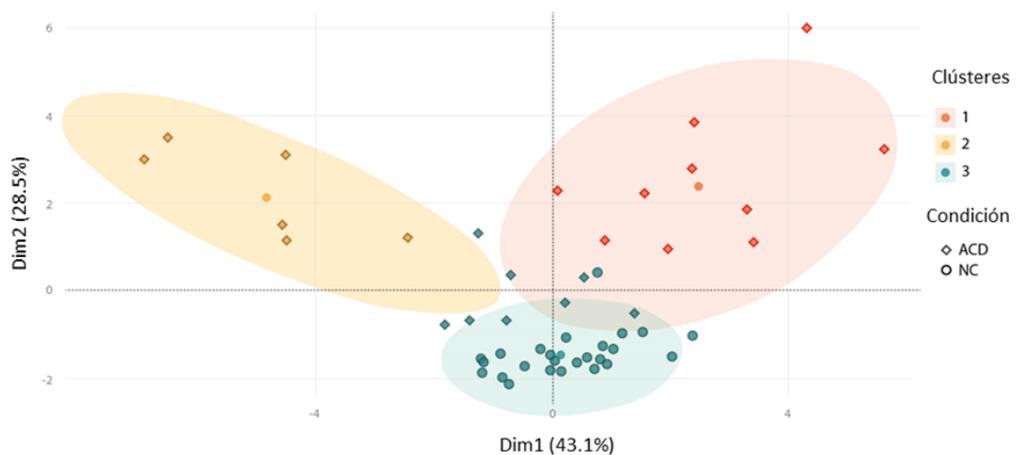


C



D

Agrupamiento jerárquico de los pacientes



6.10.7 Estudio de la expresión de los receptores TAM en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC

La **Figura 50** muestra el análisis del nivel de expresión por western blot para el receptor Tyro3. Dado que se observaron varias bandas para el receptor, se asumió que las bandas superiores a 100 kDa correspondían a la versión completa o "full". Este límite se corresponde con peso molecular calculado en base a su secuencia primaria.

Los análisis revelaron una disminución de la expresión del receptor completo en los celíacos activos. En un análisis más minucioso, se vio alterada la distribución de las formas del receptor en los pacientes ACD, observando una menor cantidad de Tyro3 completa respecto al total de esta proteína (**Figura 50-C y D**). Estas diferencias podrían estar relacionadas con potenciales cortes enzimáticos de la proteína a cargo de proteasas tisulares o de membrana celular, como ADAM10 la cual es responsable del corte de otros receptores TAM, como Axl (Lu *et al.*, 2017).

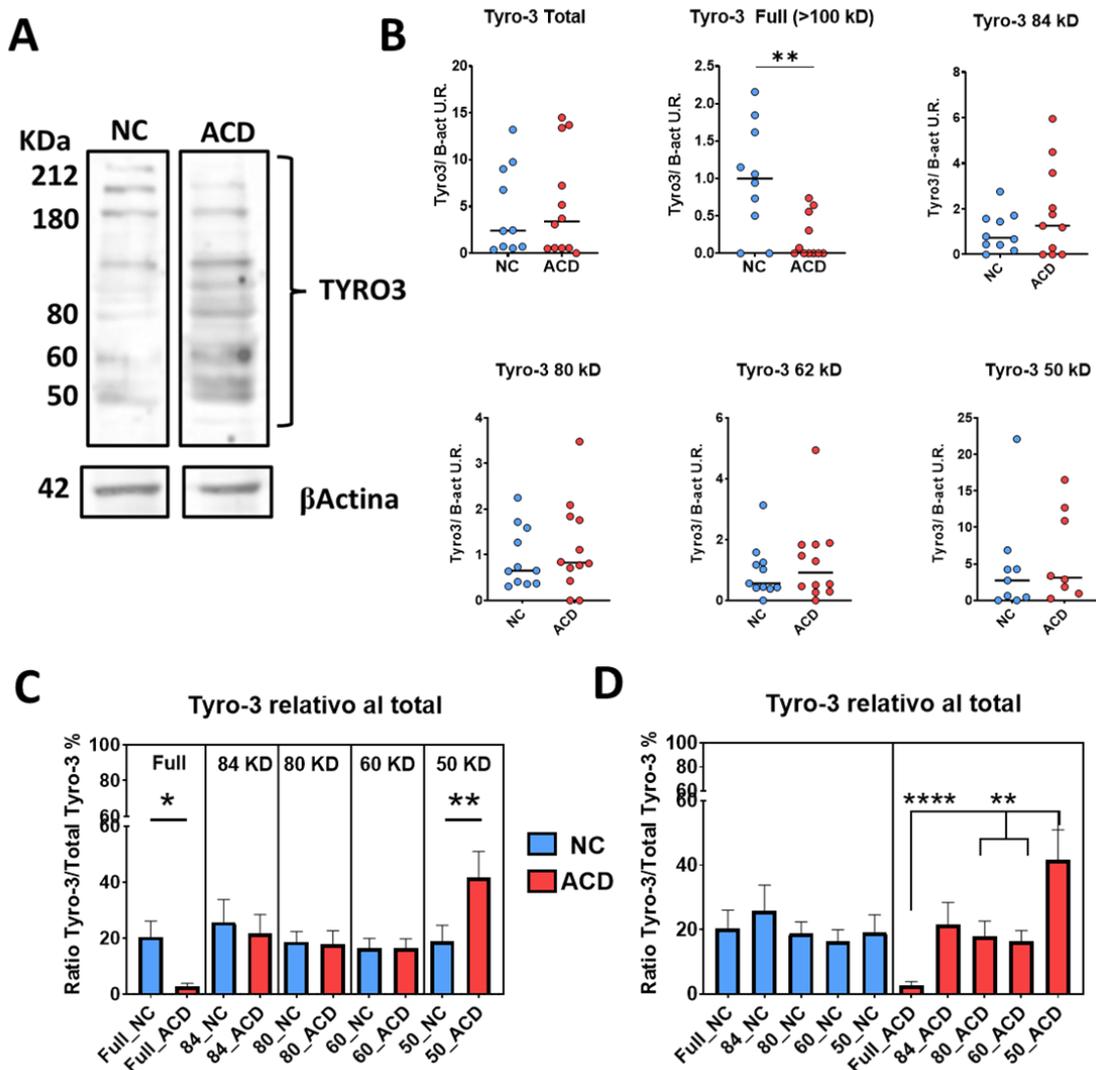


Figura 50- Análisis de la expresión de Tyro-3 en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC. **A.-** Imágenes representativas de western blot para Tyro3 en mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. En todos los casos se utilizó beta-actina como control interno de carga. Se muestran las diferentes bandas obtenidas para el marcador Tyro3. **B.-** Análisis de intensidad relativa de cada una de las bandas obtenidas para Tyro3 normalizadas con el control y de la suma de todas las bandas (TYRO3 Total) que se refiere a la suma de todas las bandas analizadas, Tyro3 full correspondientes a las bandas superiores o iguales a los 100 kDa y luego las bandas de menor peso molecular correspondientes a 84, 80, 62 y 50 kDa para los ACD (n=12) y la población NC (n=11). En este caso, los gráficos corresponden a barras con los datos de cada paciente y con el correspondiente SEM para cada población. **C.- y D.-** Análisis de la cantidad relativa de cada versión de la proteína en formato de gráfico de barra con el SEM. En (C), se muestra la comparación entre las dos poblaciones de pacientes y en (D) se muestra la comparación de la cantidad de cada banda en un mismo grupo de pacientes. En todas las comparaciones de dos grupos utilizó el análisis estadístico de “test de Student” no pareado con corrección de Welch para poblaciones con SD diferente, mientras que en el punto D, se utilizó ANOVA post-Tukey (* p<0.05; ** p<0.01; **** p<0.0001).

Para el caso del receptor Axl, en el western blot solo se pudo observar la banda de 55 kDa correspondiente al fragmento citoplasmático posterior al corte enzimático del receptor. Dicho corte se piensa es realizado por proteasas de membrana como las ADAM10/17 (Lu *et al.*, 2017). La versión correspondiente al receptor completo (110-130 kDa) no pudo detectarse por western blot a pesar de utilizar diferentes anticuerpos y modificaciones de la técnica. Como se observa en la **Figura 51**, no se encontraron diferencias significativas para la banda de 55 kDa de Axl entre las poblaciones estudiadas.

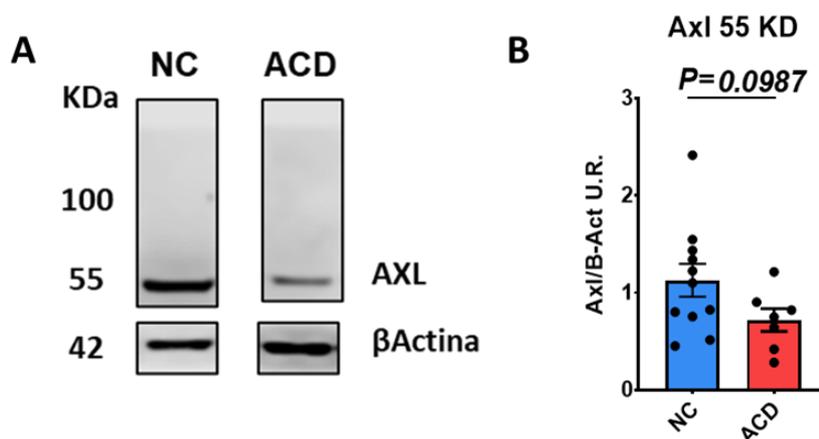


Figura 51- Análisis de la expresión de Axl en la mucosa duodenal de los pacientes ACD y NC. **A.-** Imágenes representativas del análisis por western blot para Axl en un paciente no celíaco (NC) y un paciente con EC activa (ACD). **B.-** Análisis de intensidad relativa al grupo control respecto al ratio señal de la banda de 55 kDa de Axl y el control beta actina para la población NC (n= 11) y ACD (n= 7). El análisis realizado fue por Test de Student no pareado. Se muestran los gráficos de barra de cada población con los datos de los pacientes individuales y las barras de error sistemático.

6.10.8 Estudio de la expresión de Tyro3 y Axl en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC

La **Figura 52** muestra el análisis por inmunofluorescencia para el receptor Tyro3, donde se observa la expresión en células de la *lamina propria*, como también en algunas células epiteliales dispersas en cúmulos. Se encontró un nivel de expresión comparable entre pacientes ACD y NC en ambos compartimientos, con una tendencia a una disminución en la población ACD. Esto podría deberse a que no es posible distinguir entre las

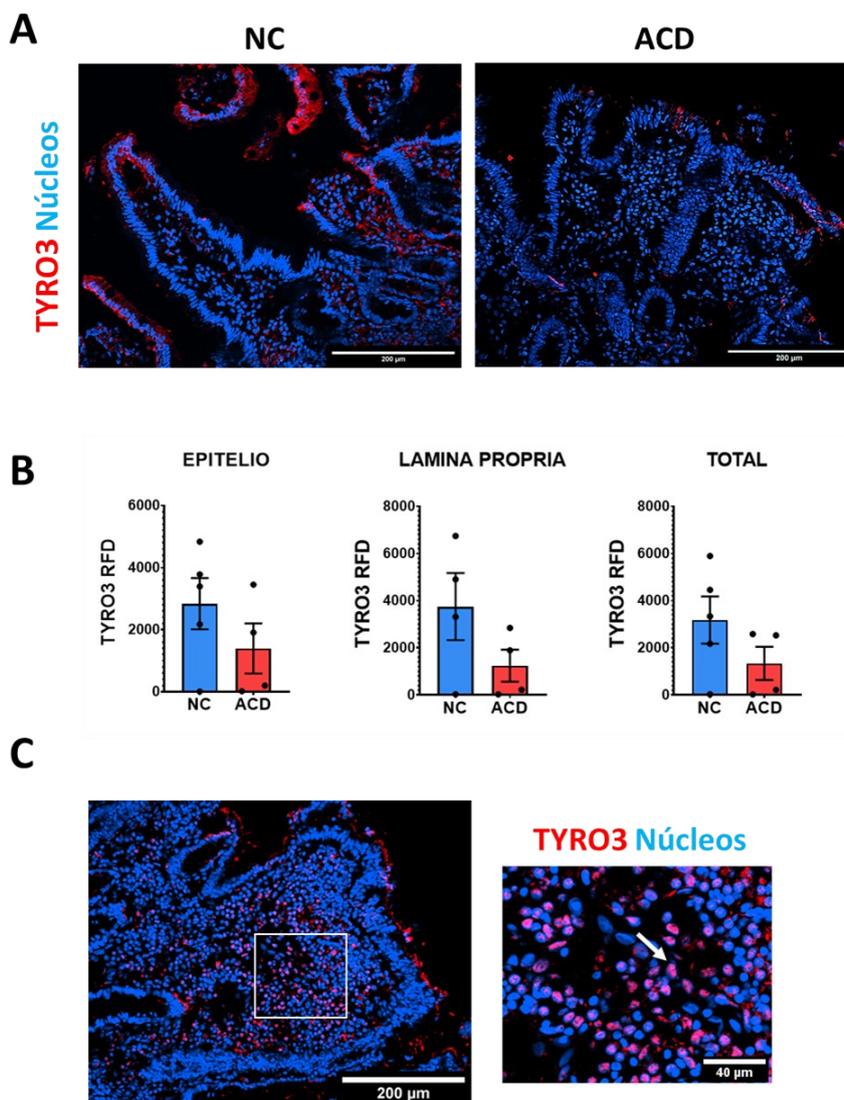


Figura 52- Análisis de la expresión de Tyro3 en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC.

A.- Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia para Tyro3 (en rojo) en pacientes no celíacos y pacientes con EC activos. Las imágenes fueron obtenidas a 200X de magnificación óptica y diferentes magnificaciones digitales. En las figuras, se muestran la escala con una barra blanca correspondiente a 200 μ m. **B.-** Análisis de RFD para Tyro3 en mucosa total y en los compartimientos epiteliales y *lamina propria* por separado para cada grupo de pacientes NC (n=4) y ACD (n=5). Los gráficos muestran las barras con el valor promedio y las barras de error (SEM). Para todos estos casos se utilizó el análisis estadístico de “test de Student” no pareado. **C.-** Imagen de la mucosa duodenal de un paciente ACD marcada contra Tyro3, junto con una zona con mayor aumento digital. Con una flecha blanca se señala algunos de las células Tyro3⁺ en el núcleo.

diferentes versiones proteicas del receptor mediante esta técnica, observando la sumatoria de todas las variantes y obteniendo un resultado semejante al obtenido por western blot al sumar todas las bandas correspondientes al receptor (**Figura 50-B “TOTAL”**). Por otro lado, basándonos en la tendencia observada, la falta de diferencias entre ambas poblaciones podría deberse al análisis de un bajo “n” en este estudio. Curiosamente, notamos que algunos pacientes celíacos activos mostraron una marca nuclear intensa para Tyro3 (**Figura 52-C**). Esto último podría relacionarse con una distribución diferente de las bandas proteicas más livianas del receptor, las cuales presentan, en algunos casos, mayor presencia en pacientes ACD (**Figura 50-C y D**). La observación de una localización nuclear para un receptor TAM no es novedoso ya que se ha descrito para MerTK (Migdall-Wilson *et al.*, 2012) o Axl (Lu *et al.*, 2017) en situaciones inflamatorias, particularmente tumores. A pesar de ello, es poco lo que se conoce sobre esta localización. La misma se ha relacionado con un rol anti-apoptótico en células tumorales para MerTK (Migdall-Wilson *et al.*, 2012) y Tyro3 (Tsai *et al.*, 2018).

La **Figura 53** muestra el análisis de la expresión del receptor Axl en la mucosa duodenal, donde tanto en pacientes ACD como NC se observa expresión del receptor. La marca se encontró en células de la *lamina propria* cercanas al epitelio apical, aunque, en algunos

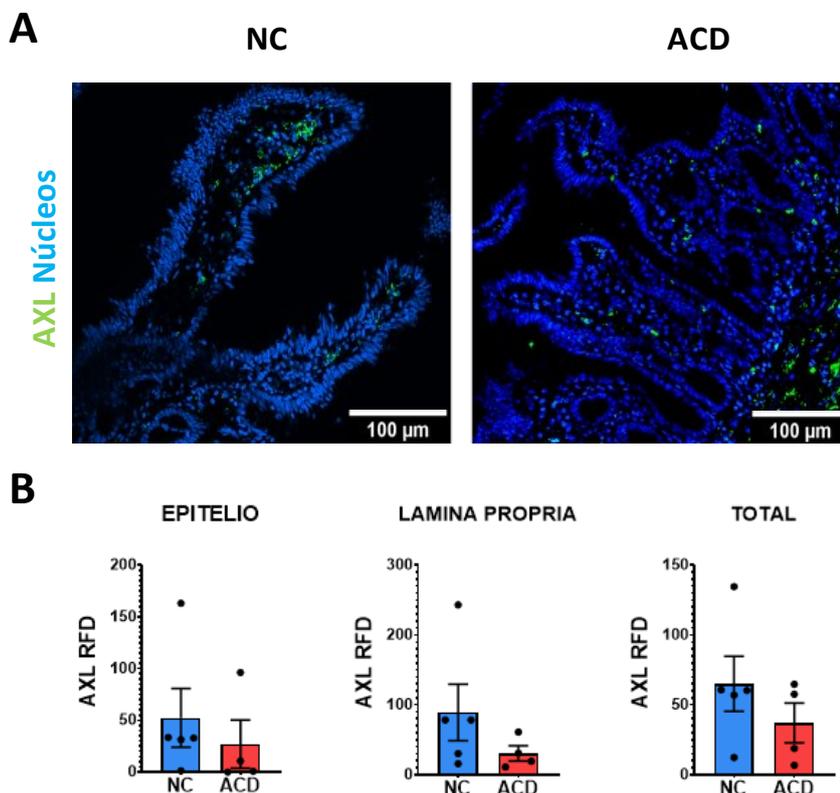


Figura 53- Análisis de expresión de AXL en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. A.- Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia para Axl (en verde) en pacientes no celíacos y pacientes con EC activos. Las imágenes fueron obtenidas con una magnificación óptica de 200X y diferentes zoom digitales, se muestran las escalas en la parte inferior de las imágenes. **B.-** Resultados del análisis de RFD para Axl correspondientes a la mucosa total, compartimento epitelial y *lamina propria* para los pacientes NC (n=5) y ACD (n=4). Los gráficos muestran las barras con el valor promedio y las barras de error (SEM). Se utilizó el análisis estadístico de “test de Student” no pareado.

casos, la capa muscular de la mucosa también presentó marcación. Curiosamente, solo se observaron pocas zonas del epitelio con marca. El análisis por RFD no confirma un aumento selectivo como el encontrado por RT-qPCR para el receptor en la población ACD.

6.10.9 Análisis de las células TAM⁺ en mucosa duodenal

Con el objetivo de realizar un análisis más detallado del eje TAM en duodeno, efectuamos un análisis por inmunofluorescencia sobre secciones de biopsias intestinales para cada uno de los receptores TAM y diferentes marcadores de linaje celular.

En la **Figura 54** se muestran los resultados para el receptor Tyro3 junto con marcadores de diferentes tipos celulares: leucocitos (CD45⁺), linfocitos T (CD3⁺), miofibroblastos (SMA⁺), macrófagos (CD64⁺) y células dendríticas (CD11c⁺). Como se puede observar, todas las poblaciones células evaluadas, incluso los enterocitos (CD45⁻), expresan Tyro3 sin distinciones entre ambas poblaciones de pacientes.

La evaluación de la expresión, como porcentaje de células Tyro3⁺, para cada una de las poblaciones celulares mencionadas mostró que los enterocitos, identificados como CD45⁻ en la zona epitelial, presentaron una expresión disminuida en los pacientes ACD. Por otro lado, no se encontraron diferencias dentro del grupo de células CD45⁺, ni CD3⁺ entre ambos tipos de pacientes (**Figura 54-C y -D**).

Alrededor de un 20% de las células dendríticas (CD11c⁺) expresan Tyro3, sin diferencias entre las dos poblaciones de pacientes (**Figura 54-E**). Se observó una tendencia a la disminución de la proporción de células CD64⁺Tyro3⁺ en los pacientes ACD (**Figura 54-D**). Si bien esto no fue significativo, es llamativa la dispersión dentro de los pacientes no celíacos. Esto puede deberse a la presencia de factores no caracterizados que favorezcan la expresión de Tyro3 en esta población.

Dada la dificultad para realizar un recuento manual de las células SMA⁺Tyro3⁺, procedimos a analizar la intensidad de fluorescencia (RFD) específica de Tyro3 dentro de la zona SMA⁺ (**Figura 54-F**). De este modo, encontramos que las células SMA⁺ presentaban una tendencia a incrementar la expresión Tyro3 en muestras duodenales de pacientes celíacos.

En base a estas observaciones, podemos considerar que los enterocitos en duodeno de los pacientes celíacos activos presentan una menor expresión del receptor Tyro3.

Para el caso de Axl se repitió el mismo esquema de análisis por inmunofluorescencia que para Tyro3. En la **Figura 55-A**, se observa que Axl fue expresado por las mismas poblaciones celulares que Tyro3. Sin embargo, este receptor no se encontró disminuido en los enterocitos de los pacientes celíacos. Sólo encontramos algunas tendencias que sugieren que Axl tendría una regulación diferencial en ciertas subpoblaciones celulares.

En los pacientes ACD, Axl presentó una tendencia a aumentar en las poblaciones CD3⁺, en especial en *lamina propria* (**Figura 55-C**), que podría ser consecuencia de la presencia de poblaciones de células T que expresen diferentes niveles del receptor.

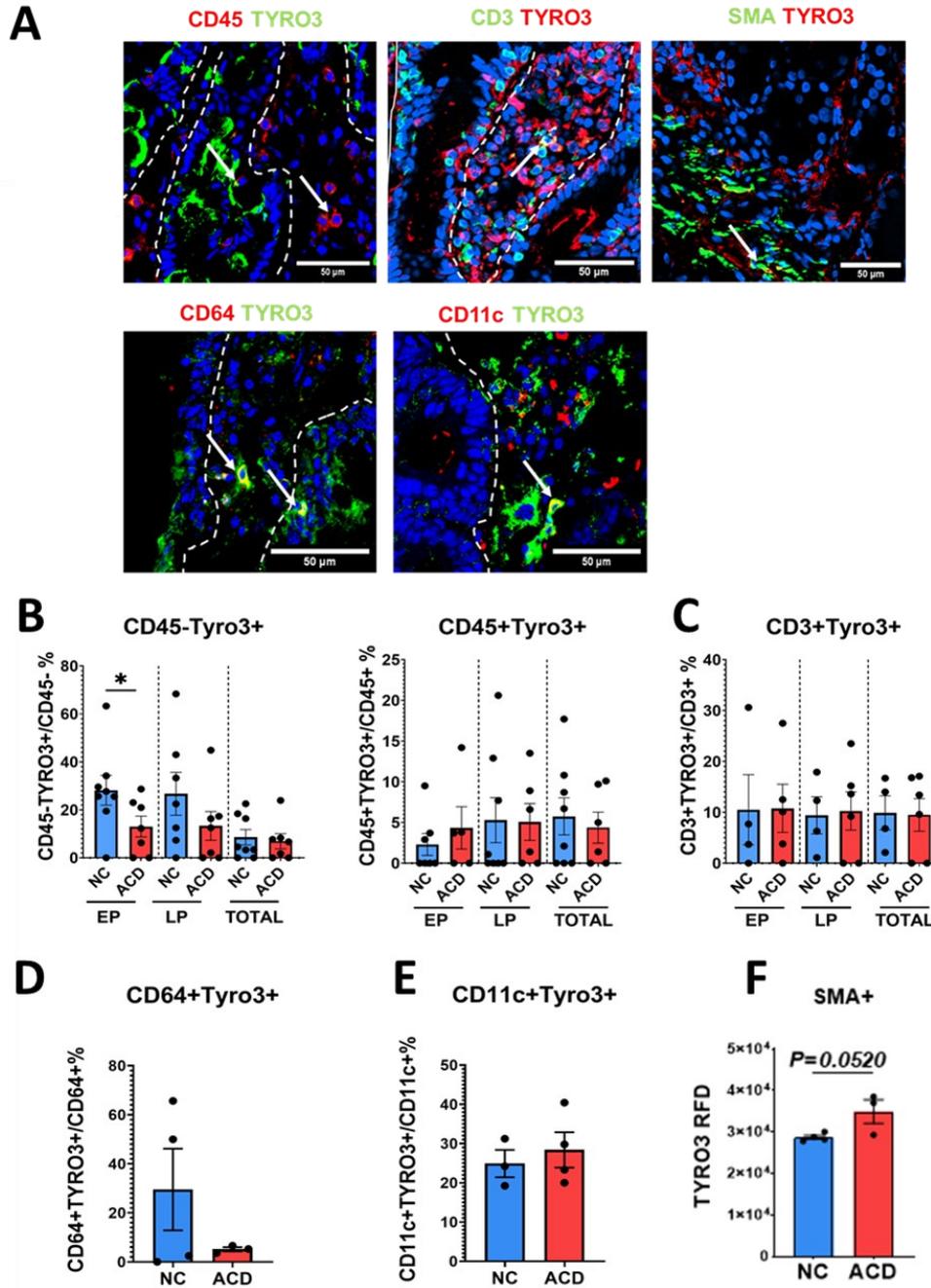


Figura 54- Análisis de las células Tyro3⁺ en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. **A.-** Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia en secciones de biopsias duodenales para la detección de Tyro3 y diferentes marcadores de linaje celular: CD45, CD64, CD11c en rojo; CD3 y SMA en verde. Las imágenes muestran la escala con una barra blanca de 50 μ m. Algunas flechas blancas indican células dobles positivas. **B.-** Análisis de células Tyro3⁺CD45⁻ y de las células Tyro3⁺CD45⁺ en el compartimiento epitelial y *lamina propria* de pacientes NC (n= 7) y ACD (n=8). **C.-** Análisis de células Tyro3⁺CD3⁺ en el compartimiento epitelial y *lamina propria* de pacientes NC (n=4) y ACD (n=6). **D.-** Análisis de células Tyro3⁺CD64⁺ en la mucosa de pacientes NC (n=4) y ACD (n=3). **E.-** Análisis de células Tyro3⁺CD11c⁺ en la mucosa de pacientes NC (n=3) y ACD (n=3). **F.-** Análisis de RFD para TYRO3 en células SMA⁺ para pacientes NC (n=3) y ACD (n=3). Los gráficos muestran las barras con el valor promedio y las barras de error (SEM). Para todos estos casos se utilizó el análisis estadístico de “test de Student” no pareado.

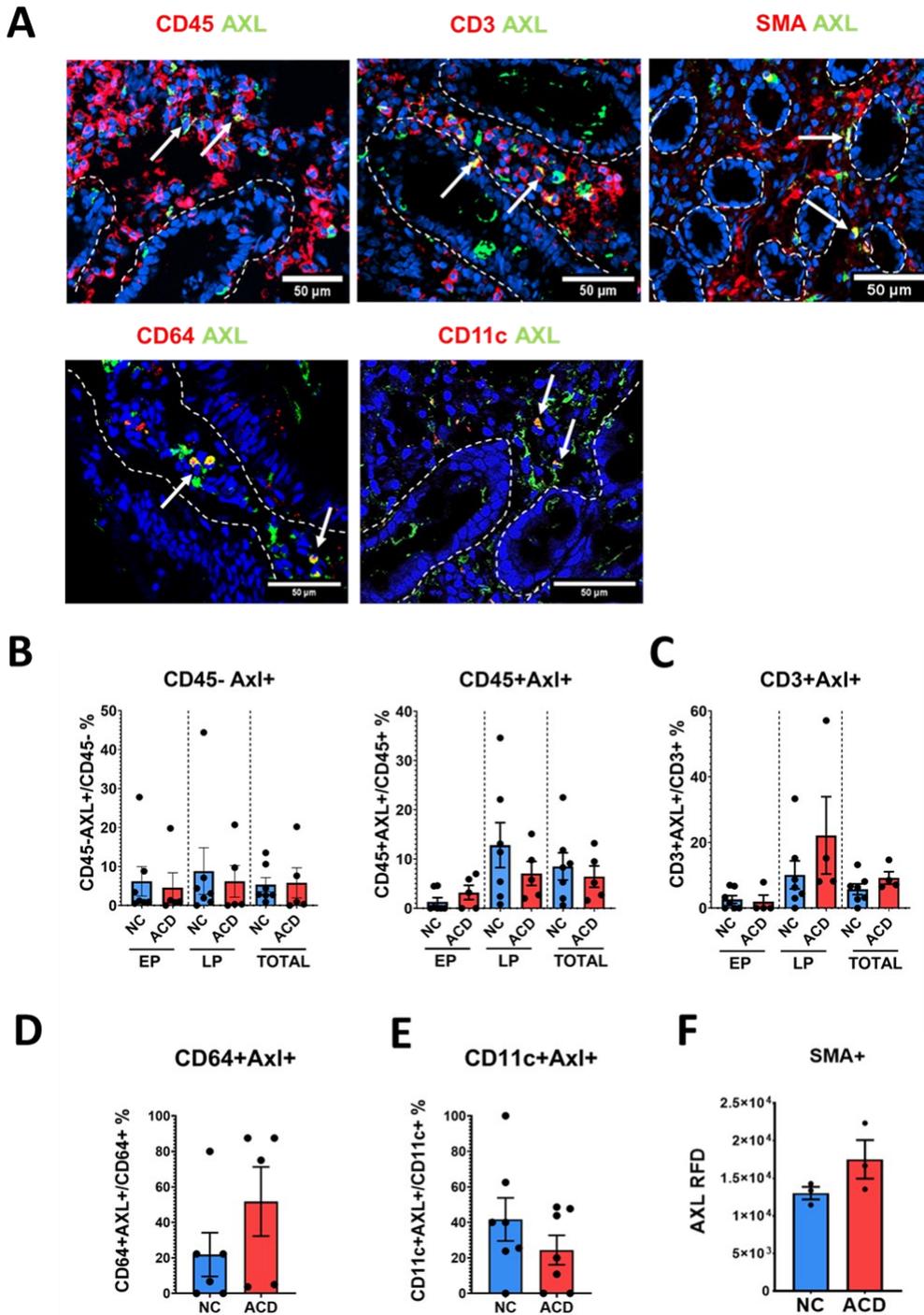


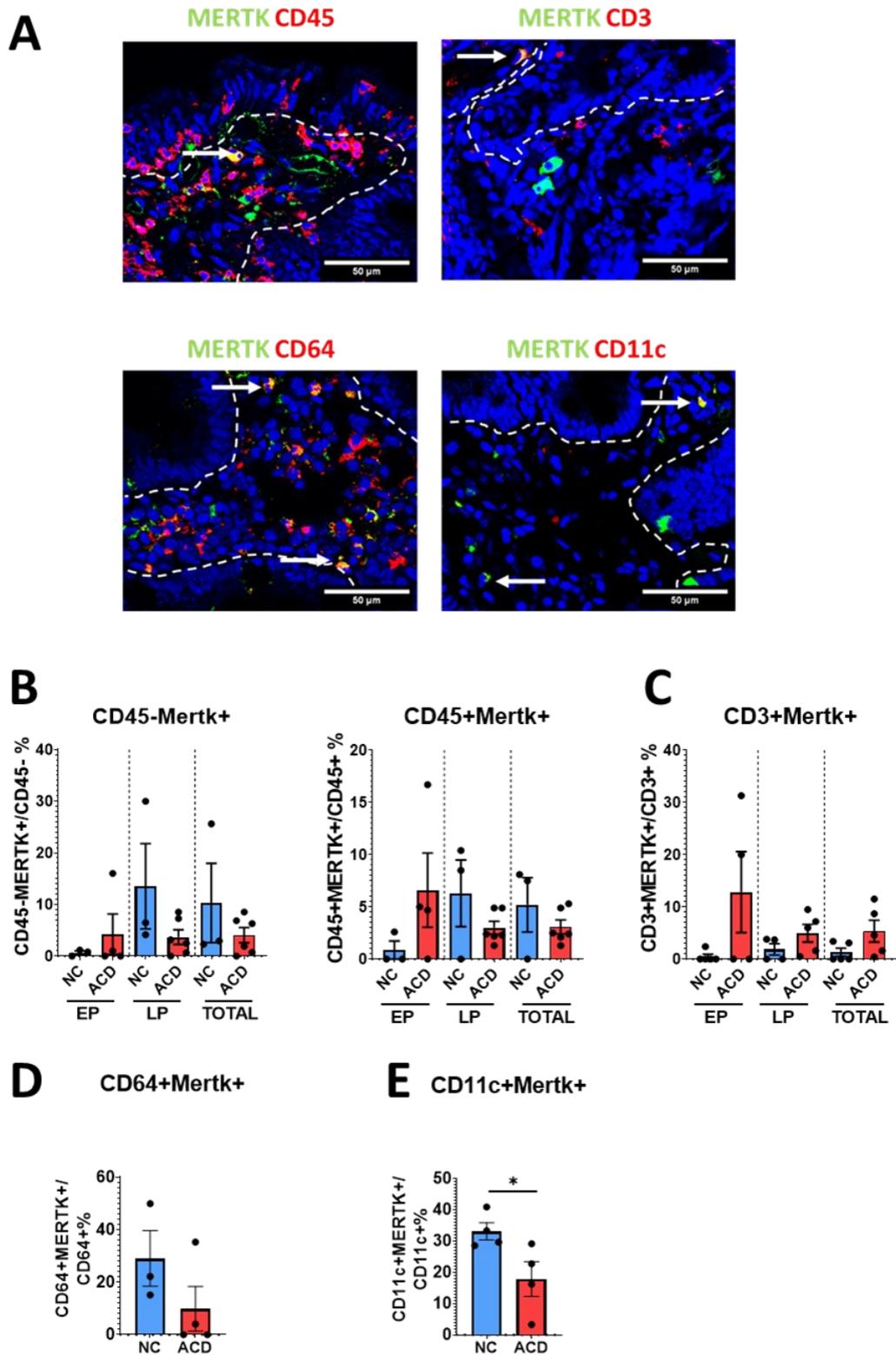
Figura 55- Análisis de las células AXL⁺ en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC. **A.-** Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia en secciones de biopsias duodenales para la detección de Axl en verde, y diferentes marcadores de linaje celular: CD45, CD3, CD64, CD11c y SMA en rojo. Las imágenes muestran la escala con una barra blanca de 50 μ m. Algunas flechas blancas indican células dobles positivas. **B.-** Análisis de células Axl⁺CD45⁻ y células Axl⁺CD45⁺ en el compartimiento epitelial y *lamina propria* de pacientes NC (n= 5) y ACD (n=4). **C.-** Análisis de células Axl⁺CD3⁺ en el compartimiento epitelial y *lamina propria* de pacientes NC (n= 7) y ACD (n=4). **D.-** Análisis de densidad de células Axl⁺CD64⁺ en la mucosa duodenal de pacientes NC (n= 6) y ACD (n=5). **E.-** Análisis de células Axl⁺CD11c⁺ en la mucosa

duodenal de pacientes NC (n= 7) y ACD (n=7). **F.-** Análisis de RFD para AXL en células SMA⁺ para pacientes NC (n=3) y ACD (n=3). Los gráficos muestran las barras con el valor promedio y las barras de error (SEM). Para todos estos casos se utilizó el análisis estadístico de “test de Student” no pareado.

Un comportamiento semejante al descrito para las células CD3⁺Axl⁺, se encontró en la población CD64⁺Axl⁺, con heterogeneidad en la proporción relativa de CD64⁺Axl⁺ dentro de ambas poblaciones de pacientes (**Figura 55-D**). Análogamente, se observó una tendencia en el índice RFD para miofibroblastos (SMA⁺) (**Figura 55-E**). Al igual que en análisis anteriores, las tendencias en parte pueden ser debidas a diferencias en factores aún no caracterizados que pueden impactar en forma diferencial en distintas poblaciones, y también a que estos análisis han estudiado un “n” bajo. Esta es una dificultad propia de estos estudios donde el acceso a muestras duodenales bien caracterizadas no es sencillo.

Por último, realizamos el análisis de expresión de MerTK en las poblaciones, CD45⁺, CD3⁺, CD64⁺ y CD11c⁺ (**Figura 56**). Todas las poblaciones analizadas presentaron proporciones variables de células MerTK⁺. Las células que mayoritariamente expresan este receptor dentro de las células CD45⁺ se encuentran entre las poblaciones de células CD3⁺, CD11c⁺ o CD64⁺. Los recuentos de las células CD3⁺MerTK⁺ presentaron una gran heterogeneidad dentro del epitelio y *lamina propria* de los pacientes ACD. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con el grupo control. Por otro lado, las células CD64⁺ o CD11c⁺ MerTK⁺ mostraron una disminución en los pacientes ACD, siendo significativo para las células dendríticas CD11c⁺MerTK⁺.

Figura 56- Análisis de las células MerTK⁺ en la mucosa duodenal de pacientes ACD y NC.
A.- Imágenes del análisis por inmunofluorescencia para MerTK en verde y diferentes marcadores de linaje celular CD45, CD3, CD64, CD11c, en rojo. Las imágenes muestran la escala con una barra blanca correspondiente a 50 µm. Las flechas blancas indican algunas de las células dobles positivas. **B.-** Análisis de células MerTK⁺CD45⁻ en el compartimiento epitelial y *lamina propria* de pacientes NC (n=3) y ACD (n=6), y a la derecha se muestran los resultados del análisis de células MerTK⁺CD45⁺ en el compartimiento epitelial y *lamina propria* de pacientes NC (n=3) y ACD (n=6). **C.-** Análisis de células MerTK⁺CD3⁺ en el compartimiento epitelial y *lamina propria* de pacientes NC (n=5) y ACD (n=4). **D.-** Análisis de células MerTK⁺CD64⁺ en la mucosa duodenal de pacientes NC (n= 3) y ACD (n=4). **E.-** Análisis de células MerTK⁺CD11c⁺ en la mucosa duodenal de pacientes NC (n= 4) y ACD (n=4). Los gráficos muestran las barras con el valor promedio y las barras de error (SEM). Para todos estos casos se utilizó el análisis estadístico de “test de Student” no pareado.



6.11 Discusión y perspectivas

En esta sección se realizó un análisis de la expresión del sistema TAM y sus ligandos con el objetivo de evaluar posibles modulaciones en los niveles de expresión de los componentes del sistema en la mucosa de pacientes celíacos activos.

Hemos observado una expresión diferencial de los ligandos Gas6 y Pros1, tanto a nivel proteico como transcripcional. Los pacientes celíacos no tratados mostraron una inducción de Gas6 y una disminución en los niveles de Pros1. Este hallazgo es de destacar ya que en pocos modelos inflamatorios y patologías se puede observar una modulación diferencial y opuesta en el nivel de expresión de estos componentes. De esta manera, se describió que Gas6 se induce en el epitelio de la mucosa oral, en respuesta a la presencia de la microbiota, fenómeno dependiente de la vía del MyD88 (Nassar, Tabib, Capucha, Mizraji, Nir, Pevsner-Fischer, *et al.*, 2017; Nassar *et al.*, 2018). También resulta interesante que esta es la única publicación que estudia la expresión de los ligandos TAM en las mucosas sin asociarlo a tumores.

Por otro lado, no es sencillo encontrar una causa que explique la disminución de la expresión de Pros1 coexistente con un aumento de Gas6. De hecho, dentro de la población celíaca no se encontró una correlación negativa significativa entre ambos factores, sino que dicha correlación aparece cuando se consideran ambas poblaciones de pacientes. De tal forma, que se podría sugerir que el control de la expresión de Pros1 es independiente de Gas6 en los pacientes ACD.

Los resultados muestran una regulación compleja de los receptores TAM en la enteropatía celíaca. El análisis de RT-qPCR mostró un aumento en el nivel de expresión del gen *AXL* en la población ACD. De forma complementaria, el PCA extendió este resultado, sugiriendo una regulación similar entre los tres receptores, y la vía de IFNs. Sin embargo, los análisis posteriores que evaluaron el nivel de expresión proteico de los tres receptores ofrecieron un escenario más complejo de interpretar.

Para el caso de Tyro3, mediante western blot, comprobamos que la versión completa (“full”) del receptor se encuentra reducida en los pacientes ACD; sin embargo, no se encontraron diferencias a nivel de ARNm. Esto sugiere la intervención de modificaciones postraduccionales entre las que podemos considerar dos posibilidades. Una es el clivaje por proteasas como ADAM10/17, que ha sido documentado para otro receptor TAM como Axl (Lu *et al.*, 2017). Por otro lado, pueden existir modificaciones en la glicosilación, observado para MerTK (Migdall-Wilson *et al.*, 2012) y para el propio Tyro3 (Al Kafri and Hafizi, 2020). Es posible que dichas modificaciones determinen una relocalización intranuclear del fragmento intracelular de Tyro3. De hecho, ambos procesos regulan la localización nuclear de MerTK y Axl en ciertas células. Además, debemos considerar que un posible corte enzimático del receptor generaría una versión soluble de Tyro-3 (sTyro-3). Este factor ejerce un rol inhibitorio de la vía TAM al competir con los TAM de membrana (Ballantine *et al.*, 2015).

Por otro lado, los recuentos de las células Tyro3⁺ mostraron una disminución en la expresión de este receptor en los enterocitos de los pacientes celíacos activos. Estas observaciones sumadas a los resultados obtenidos por western blot, sugieren que la regulación de la expresión de esta proteína es dependiente de la población celular y que, a su vez, las células como los enterocitos, pueden tener diferencias en la expresión de las versiones más pesadas.

Para el caso de Axl su expresión genética se encontró inducida en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos. Sin embargo, a nivel proteico, no se observaron diferencias en la expresión de este receptor entre las poblaciones de pacientes estudiadas. Por otro lado, encontramos que Axl se expresó en ciertas células CD45⁺, particularmente en las células T de *lamina propria* y epitelio, como así también en algunas células SMA⁺ (miofibroblastos). No obstante, no observamos diferencias significativas en la abundancia relativa de estas poblaciones Axl⁺ entre las cohortes de pacientes analizados. Solamente se observaron tendencias, no significativas, a una expresión incrementada de Axl en células CD64⁺ de la mucosa duodenal de los pacientes celíacos. Si sumamos el hecho que encontramos un aumento del número de células CD68⁺Gas6⁺ en los pacientes celíacos, es posible que, el eje Gas6/Axl en las estas poblaciones de macrófagos CD64⁺ y CD68⁺ sea relevante en la remoción de cuerpos apoptóticos presentes en la *lamina propria*. Consecuentemente, este eje podría tener un rol importante en la inducción de un fenotipo regulatorio en los macrófagos.

En el estudio del receptor MerTK, encontramos que los valores relativos de ARNm no tuvieron diferencias entre la población ACD y la NC. Sin embargo, no podemos asegurar que los mecanismos dependientes de MerTK no se vean afectados por la disminución de Pros1 en el tejido, o por la posible competencia de Gas6 con sTyro3 o sAxl que podrían encontrarse incrementados en la enteropatía celíaca. Por otro lado, el análisis por inmunofluorescencia mostró que un subgrupo de pacientes ACD presentaban una expresión incrementada de células T MerTK⁺ distribuidas entre el epitelio y la *lamina propria*. Esta observación puede ser de interés si consideramos que las células T CD8⁺ utilizan a MerTK como un correceptor estimulador (Peeters *et al.*, 2019).

Entre las células con función fagocítica, las células CD64⁺MerTK⁺ presentaron una tendencia a disminuir en los pacientes ACD. Esta observación puede relacionarse con una reducida capacidad de generar un entorno regulador de las respuestas tipo I y reparador, normalmente inducido en macrófagos por citoquinas IL-4 e IL-13 (Bosurgi *et al.*, 2017; Triantafyllou *et al.*, 2018). No obstante, es posible que estas poblaciones celulares sean suficientes para mediar la remoción de los cuerpos apoptóticos en la mucosa celíaca junto con poblaciones que expresen los otros receptores TAM, Axl y Tyro3, y que actuarían de manera redundante en este proceso, como se observó en modelos *in vitro* (Seitz *et al.*, 2007). Por último, encontramos que las células dendríticas, CD11c⁺MerTK⁺ están disminuidas en la población celíaca. La expresión de MerTK en estas células ha sido asociada a un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células T por competencia por los ligandos TAM con las células T locales (Peeters, Rahbech and thor Straten, 2020). A su vez, en ciertos modelos murinos, la expresión de MerTK en las células dendríticas es relevante para la inducción de tolerancia a autoantígenos en células T, mediada por fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Wallet *et al.*, 2008). Por lo tanto, es posible que la reducción en el número de células dendríticas CD11c⁺MerTK⁺ tenga un rol en la pérdida de función regulatoria, y por ende esto ocasione un aumento de la respuesta inflamatoria en la patogenia de EC.

Por lo comentado en los párrafos anteriores, el eje TAM pueden tener diferentes roles en el control de la respuesta inmune en intestino delgado. Es factible que la elevada expresión de Gas6, junto a la expresión variable de Axl, sea suficientes para la correcta remoción de cuerpos apoptóticos en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos. Aunque no necesariamente las funciones de los macrófagos sean equivalentes y/o redundantes. Por ejemplo, la expresión diferencial de los receptores TAM ha sido asociada al ambiente inflamatorio, donde Axl puede ser expresado en macrófagos M1,

inducido por LPS o IFN γ , mientras que MerTK se expresa en fenotipos M2 asociados a la resolución de la inflamación (Zagórska *et al.*, 2014). En ambas situaciones, los macrófagos son capaces de fagocitar cuerpos apoptóticos, pero, el entorno en que CD64⁺ MerTK⁺ o Axl⁺ son funcionales dependerá de las señales dominantes.

Se desconoce la asociación entre los perfiles de células T y la expresión selectiva de los receptores TAM. No obstante, la expresión de MerTK en células T CD4⁺ o CD8⁺ se asocia con la activación mediante su TCR, y funcionaría como una molécula coestimuladora tardía (Cabezón *et al.*, 2015; Peeters *et al.*, 2019). Esto podría explicar por qué encontramos aumentada la población de células T MerTK⁺ en algunos pacientes ACD. Para comprender con más detalle esta asociación se deberían realizar estudios que permitan determinar en simultáneo MerTK con marcadores de activación de las células T, y de perfil Th. Para el estudio de Axl o Tyro3 en los linfocitos T disponemos de menos información aún. Axl se expresa tanto en células Th1, como en Treg, por lo que su rol y función puede ser simplemente la promoción de ambas poblaciones expuestas a Gas6 (Batchu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017; Peeters, Rahbech and thor Straten, 2020).

Una situación similar se encuentra para los ligandos Gas6 y Prosl en linfocitos T, donde la información es limitada. Si bien se observó la expresión incrementada de Gas6 en los LIEs, no conocemos el mecanismo de inducción ni la funcionalidad. Por otro lado, se sabe que Prosl se induce frente a la activación de los linfocitos T CD8⁺, y en particular, IL-4, junto con la activación por TCR, induce su expresión en células T CD4⁺ (Chan *et al.*, 2016; Peeters *et al.*, 2019). A su vez, los pacientes celíacos se caracterizan por tener un incremento de células T CD4⁺ de perfil Th1, y células T CD8⁺, con baja expresión de citoquinas Th2 (Nilsen *et al.*, 1998; Meresse *et al.*, 2006; Bouziat *et al.*, 2017). Por ende, las dos poblaciones T que expresan a Prosl pueden tener cambios opuestos, dejando un balance neto dentro de las células CD3⁺ que no se diferencia entre la población ACD y NC. Estas hipótesis quedan pendientes de ser confirmadas en futuros ensayos.

Dado que encontramos una disminución en la expresión de Tyro3 en epitelio y un aumento del número de LIEs Gas6⁺ en los pacientes celíacos, pensamos que podría ser un mecanismo similar al de un evento descrito en un contexto tumoral (Peeters, Rahbech and thor Straten, 2020). En este modelo, se consideró una competencia por los ligandos entre las células T y células estromales que expresan TAM. De esta forma, dado que Tyro3 fue el receptor TAM más expresado en el epitelio, su disminución limitaría la capacidad de los enterocitos para captar Gas6/Prosl, y de esta forma, favorecería la de los LIEs. A su vez, debemos tener en cuenta que los receptores TAM ejercen un rol antiinflamatorio, e inhibidor del reclutamiento de los linfocitos T en epitelio (Kim *et al.*, 2019). Por ello, es posible que, en los pacientes celíacos con incremento de LIEs Gas6⁺ y MerTK⁺, el eje TAM sea promotor de respuestas mediadas por estas células T, mientras que en pacientes con menor abundancia de LIEs TAM⁺, este eje regule el número de LIEs, mediante la regulación de la expresión de quimoquinas (Kim *et al.*, 2019). Si bien, estas son especulaciones, aportan una visión novedosa de mecanismos de regulación de respuesta inmune en el epitelio que merecen estudios detallados.

Dado que el eje TAM tiene múltiples conexiones con distintas vías de la respuesta inmune, realizamos estudios de correlación con datos de expresión obtenidos para el eje y los IFNs. El análisis de RT-qPCR y el PCA mostraron una asociación entre Gas6 y los IFNs tipo I y II; y entre los TAM con USP18 y SOCS1 (biomarcadores de los IFNs tipo I). Esto puede ser una consecuencia de la interacción entre el eje TAM y los IFNs, ya que, como hemos mencionado, la vía intracelular de los IFNs es regulada por los receptores TAM, y al mismo tiempo, los IFNs modulan la expresión de los componentes

del eje TAM (Rothlin *et al.*, 2007). También debemos considerar que diferentes factores, como los agonistas TLRs, puedan regular ambas vías, como se observó en epitelio gingival donde la activación de la señalización por MyD88 regula la expresión de Gas6 (Nassar, Tabib, Capucha, Mizraji, Nir, Pevsner-Fischer, *et al.*, 2017).

El contexto inflamatorio y la presencia de IFNs en la mucosa duodenal en EC explicarían la inducción de componentes del eje como Gas6 y Axl que se encontraron aumentados. Esta observación está en línea con la correlación de los TAM con SOCS1. Este factor es un regulador de la vía de IFNs, que se encuentra inducido en la población de pacientes celíacos estudiada. Otros biomarcadores, como IRF1 y MX1, también muestran la actividad de la vía de los IFNs en EC. Por lo tanto, dada la complejidad de las señales de inducción y regulación en las distintas poblaciones celulares, es difícil comprender la interacción del eje TAM y los IFNs en la mucosa intestinal.

Es de destacar que los análisis de expresión mediante PCA permitieron diferenciar dos subgrupos de pacientes celíacos que se separaron del grupo control. Esto es interesante, dado que abre una nueva perspectiva para la caracterización de las vías dominantes en estas poblaciones de pacientes que podrían relacionarse con aspectos propios de cada grupo como su presentación clínica, enfermedades asociadas, entre otros.

6.12 Conclusiones

Los componentes del sistema TAM se encuentran expresados en diversas células de la mucosa duodenal. En particular, los receptores Tyro3 y Axl, se encontraron en células T, enterocitos, células dendríticas, macrófagos y miofibroblastos. Por su parte, MerTK se observó en células T, y células presentadoras de antígeno CD64⁺ y CD11c⁺. Por otro lado, diferentes poblaciones de células endoteliales, enterocitos, células CD45⁺, entre ellas células T, y presentadoras de antígenos expresaron Gas6. Mientras que las células Pros1⁺ resultaron ser enterocitos, linfocitos T y dendríticas.

Los componentes del sistema TAM se encuentran modulados heterogéneamente en la enteropatía celíaca. Mientras Pros1 y Tyro3 en su versión completa, presentan una menor expresión en los pacientes celíacos, se observa lo contrario para Gas6. A su vez, se encontró una disminución de enterocitos Tyro3⁺, y de células MerTK⁺CD11c⁺ en los pacientes celíacos. Sólo en algunos pacientes se observa un incremento de linfocitos intraepiteliales MerTK⁺. De esta forma, se observa un predominio a la interacción Gas6/Axl en duodeno de pacientes celíacos.

El sistema TAM y mediadores inflamatorios descritos en enfermedad celíaca, en especial los IFNs, se encuentran asociados. El IFNB1 correlacionó positivamente con los niveles de Gas6, mientras que la expresión de los receptores TAM se asoció con ciertos biomarcadores de la vía de IFNs, como USP18, y SOCS1.

El análisis de componentes principales, basado en datos de expresión, permitió diferenciar dos subgrupos de pacientes celíacos indicando la predominancia de diferentes vías de la respuesta inmune en cada grupo.

7 Comentario final integrador

En esta sección se discutirá de forma integradora las tres partes del trabajo de Tesis. Como hemos comentado en la introducción general, la EC es explicada a través de un mecanismo patogénico que depende de una respuesta inmune específica e inadecuada a péptidos derivados del gluten. Sin embargo, este mismo mecanismo presenta cierta complejidad al analizar la importancia e interacciones entre los potenciales factores genéticos, y ambientales predisponentes. Además, en los últimos años el estudio de diversas citoquinas proinflamatorias como los IFNs, ha permitido conocer nuevas vías proinflamatorias que podrían asociarse con la EC, pero que aún no han sido estudiados en dicho contexto. Estos procesos, implican rutas de estrés celular, polarización a fenotipos pro-inflamatorios en células dendríticas, muerte celular proinflamatoria, modulación de poblaciones regulatorias del sistema inmune, entre otros. Asimismo, debido a que los factores genéticos y ambientales asociados a la EC pueden modular estas vías inflamatorias, resulta necesario el estudio integrado de estas vías y factores en los pacientes celíacos activos. Por este motivo, en este trabajo nos propusimos estudiar y describir algunos de estos procesos, así como vías moleculares potencialmente asociadas a la patogenia de la EC.

Desde hace décadas, se conoce que los IFNs son parte esencial en la respuesta inmune frente al gluten en los pacientes celíacos activos (Nilsen *et al.*, 1998; Abadie *et al.*, 2011). Estas moléculas (principalmente IFNs tipo I y II) ejecutan mecanismos pro-inflamatorios asociados a la pérdida de tolerancia al gluten en ciertos modelos murinos (Bouziat *et al.*, 2017). Adicionalmente, nosotros hemos asociado a la EC con los IFNs tipo III (o lambda), vinculados a un rol inflamatorio en las mucosas. En este estudio, observamos que la expresión de los tres tipos de IFNs se encuentra aumentada en los pacientes celíacos.

Es importante mencionar que en los pacientes celíacos no solo se expresan mayores niveles de IFNs, sino también de sus biomarcadores característicos (MX1, IRF1, USP18). Por todo ello, consideramos que distintas vías moleculares mediadas por los IFNs pueden estar implicadas en la patogenia de la EC. En este sentido, ciertas vías de estrés celular inducidas por los IFNs conllevan eventualmente a la muerte celular programada, tanto apoptótica como necrótica. Como ya se ha comentado, resultados aún no publicados de nuestro grupo de trabajo indican la existencia de vías moleculares asociadas a los procesos de muerte celular programada proinflamatoria en los pacientes celíacos. Muchos de estos procesos son modulados positivamente por los IFNs, ya sea por medio del control en la expresión de factores fundamentales en la necroptosis (ZBP1, IRF1, MLKL), la piroptosis (AIM2, IFI16, IL18, ZBP1, CASP1, CASP4, GSDMD), y en la apoptosis (BAK, BCL2, MICA, TP53, HLA.E, entre otros) (Tang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Perez *et al.*, 2021). En consecuencia, los IFNs pueden inducir una nueva ola de la respuesta inflamatoria por medio de la promoción de estos procesos que conllevan a la liberación de alaminas (ej.: IL-33, IL-1 α y HMGB1), y citoquinas inflamatorias (ej.: IL-1 β e IL-18).

El conjunto de factores denominados alarminas es muy grande, por ello nosotros nos hemos centrado en el estudio de IL-33, HMGB1 e IL-1 α . Estas proteínas, normalmente de localización nuclear, son liberadas al medio extracelular por activación de vías asociadas al estrés inflamatorio y por medio de muerte celular proinflamatoria. Como hemos mencionado, los IFNs pueden regular la expresión y liberación de estas moléculas, y de sus receptores celulares. Esto último, determina el tipo de células que responden a las alarminas, y el rol biológico de las mismas. De esta forma, el receptor de HMGB1, RAGE, es modulado por la vía de IFNs, e incluso demostramos una correlación entre la expresión de este receptor e IFN γ . Por otro lado, los IFNs tienen la capacidad de inducir el acumulo de HMGB1 en citosol, promoviendo su liberación (Lu *et al.*, 2014). A su vez,

los IFNs también modulan el tipo de respuestas ejecutadas por ciertas alarminas, como la IL-33. De esta manera, en presencia de IFNs y otras señales asociadas a la EC, como IL-23A, la IL-33 es incapaz de inducir respuestas pro-Th2, o pro-Tregs, y en su lugar, promueve una respuesta citotóxica (Molofsky, Savage and Locksley, 2015).

Por su parte, las alarminas tienen un rol promotor de la expresión y potenciación de ciertas funciones biológicas de los IFNs. De esta forma, IL-1 α presenta la capacidad de potenciar las respuestas antivirales iniciadas por IFN γ (Hurgin *et al.*, 2007). Además, IL-1 α es capaz de promover indirectamente las respuestas inflamatorias al inhibir las células Treg (Schenten *et al.*, 2014). Por su parte, IL-33 es capaz de potenciar el perfil citotóxico de ciertas células NK, y linfocitos T CD8⁺ (Yang *et al.*, 2011; Bonilla, Frohlich, *et al.*, 2012; Baumann, W. V Bonilla, *et al.*, 2015; Ochayon *et al.*, 2019), mientras que HMGB1 es capaz de potenciar el perfil M1 en macrófagos (Schaper *et al.*, 2016). A su vez, es importante destacar que HMGB1 induce la polarización a Th1 durante la presentación antigénica, y potencia la expresión de IFNs por medio del transporte de material genético, y otros DAMPs, al citosol (Messmer *et al.*, 2004; Rovere-Querini *et al.*, 2004; Harris, Andersson and Pisetsky, 2012). Si bien, no todos los mecanismos mencionados han sido probados en EC, la asociación que hemos encontrado entre las alarminas, y la EC indicaría que pueden estar presentes como parte de los mecanismos de su patogenia. Este es el primer trabajo, del cual tengamos conocimiento, que evaluó en forma integral a las diferentes alarminas en la enteropatía celíaca, y es claro que deben realizarse nuevas investigaciones destinadas a definir el rol de estos factores en la patogenia de la enfermedad.

Por otro lado, también estudiamos el eje TAM, el cual presenta diferentes funciones relacionadas al sistema inmune, siendo capaz de regular la respuesta inflamatoria en las células del sistema inmune innato, y en particular, inhibir la respuesta a IFNs (Rothlin *et al.*, 2007). Además, este sistema promueve la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (evitando la necrosis secundaria), y controla la respuesta de ciertas células T (Rothlin *et al.*, 2007; Peeters *et al.*, 2019; Peeters, Rahbech and thor Straten, 2020). Por ello, consideramos de interés la evaluación de este eje, que no había sido estudiado en intestino delgado.

Nuestros resultados indican que Gas6 es el ligando predominante de este eje en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos. A su vez, diferentes tipos celulares expresan esta proteína, en especial ciertos tipos de macrófagos y células T del compartimiento epitelial. Debido a las correlaciones encontradas entre Gas6 y los IFNs, es posible que estos factores regulen la expresión de esta proteína. Sin embargo, se debe considerar también que la inducción de ambos podrían ser eventos simultáneos, inducidos por la activación del TCR en los LIE, o la presencia de ligandos TLRs vía MyD88. Por ende, se requiere de nuevas investigaciones para poder concluir el fenómeno que domina la expresión de Gas6 en los pacientes celíacos.

Por otro lado, observamos una expresión variable de Pros1, y los tres receptores TAM en distintas células de la mucosa intestinal. Por el momento, los resultados indican que los macrófagos expresan niveles variables de los receptores TAM y de Gas6, lo cual les permitiría fagocitar los cuerpos apoptóticos y controlar la vía de IFNs y otras citoquinas inflamatorias. Sin embargo, otra es la situación de los LIEs, los cuales presentan expresión de Gas6 y de los tres TAM de forma heterogénea dentro de los pacientes celíacos. En estas células, como se ha descrito para ciertas células T CD8⁺Mertk⁺IFN γ ⁺, el sistema TAM podría promover las respuestas mediadas por los diferentes perfiles T.

Por ello, es claro que la complejidad de este sistema requiere de nuevos estudios específicos de cada población celular estudiada.

Desde otro punto de vista, es interesante que los IFNs regulen la expresión de los TAM, ya que permite asociar la expresión de biomarcadores de los IFNs con la expresión de los tres receptores de esta vía en EC. A su vez, las funciones regulatorias de este eje contrastan con ciertos roles inflamatorios que se asocian a funciones reguladas por los IFNs. En este sentido, tenemos que mencionar la participación de la vía TAM en la inducción de respuestas inflamatorias al promover la necroptosis, y la consecuente liberación de alarminas (Najafov *et al.*, 2019). Siendo este evento generalmente regulado y promovido por los IFNs (Sarhan *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020), podemos plantear si es posible que ciertas células TAM⁺, en presencia de Gas6 (o Pros1) y una señal persistente de IFNs, podría inducir dichas vías inflamatorias en la mucosa de los pacientes celíacos no tratados. Esta hipótesis será motivo de estudio de futuros trabajos de nuestro grupo de investigación.

Aunque se conoce con detalle parte del mecanismo de patogenia de la enfermedad celíaca, es cierto que trabajar con pequeñas piezas de tejido, la heterogeneidad entre los pacientes celíacos y no disponer de un modelo animal que reproduzca la patología, limita la realización de estudios más detallados, en especial, sobre las etapas iniciales de los mecanismos de daño en el intestino delgado. En este sentido, destacamos la complejidad asociada al estudio de las diversas vías con las que los IFNs regulan aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa. Los mecanismos de estrés celular, regulación de eventos clave en la respuesta inmune (ej. el eje TAM), y la muerte celular, podrían ser parte de la inducción de fenotipos celulares proinflamatorios que participan en la pérdida de tolerancia al gluten, y que conducen al daño en la mucosa de intestino delgado en los pacientes celíacos. Las observaciones realizadas en este trabajo son parte de un estudio más amplio que tiene por objetivo estudiar el impacto de los IFNs, la inducción de muerte celular programada, y el rol de las alarminas en la patogenia de la enfermedad celíaca, y su relación con otras enfermedades inflamatorias crónicas.

8 Referencias Bibliográficas

- Abadie, V. *et al.* (2011) 'Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis', *Annual Review of Immunology*, 29, pp. 493–525. doi: 10.1146/annurev-immunol-040210-092915.
- Abadie, V. *et al.* (2020) 'IL-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease', *Nature*, 578(7796), pp. 600–604. doi: 10.1038/s41586-020-2003-8.
- Abdulrazzaq, Y. *et al.* (2018) 'Occurrence of Hypothyroidism, Diabetes Mellitus, and Celiac Disease in Emirati Children with Down's Syndrome', *Oman medical journal*, 33(5), pp. 387–392. doi: 10.5001/OMJ.2018.72.
- Abram, C. L. and Lowell, C. A. (2017) 'Shp1 function in myeloid cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 102(3), pp. 657–675. doi: 10.1189/jlb.2mr0317-105r.
- Adinolfi, L. E., Mangoni, E. D. and Andreana, A. (2001) 'Interferon and ribavirin treatment for chronic hepatitis C may activate celiac disease', *The American journal of gastroenterology*, 96(2), pp. 607–608. doi: 10.1111/J.1572-0241.2001.03574.X.
- Afonina, I. S. *et al.* (2011) 'Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α ', *Molecular Cell*, 44(2), pp. 265–278. doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.037.
- Afonina, I. S. *et al.* (2015) 'Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme', *Immunity*, 42(6), pp. 991–1004. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.003.
- Al-Sadi, R. *et al.* (2010) 'IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF- κ B pathway', *American Journal of Pathology*, 177(5), pp. 2310–2322. doi: 10.2353/ajpath.2010.100371.
- Alexander, W. S. *et al.* (1999) 'SOCS1 Is a Critical Inhibitor of Interferon γ Signaling and Prevents the Potentially Fatal Neonatal Actions of this Cytokine', *Cell*, 98(5), pp. 597–608. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80047-1.
- Allegretti, Y. L. *et al.* (2013) 'Broad MICA/B Expression in the Small Bowel Mucosa: A Link between Cellular Stress and Celiac Disease', *PLoS ONE*. Edited by K. Sestak, 8(9), p. e73658. doi: 10.1371/journal.pone.0073658.
- Alvarez, F., Fritz, J. H. and Piccirillo, C. A. (2019) 'Pleiotropic effects of IL-33 on CD4⁺ T cell differentiation and effector functions', *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), p. 522. doi: 10.3389/fimmu.2019.00522.
- Anderson, R. P. *et al.* (2005) 'T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease', *Gut*, 54(9), pp. 1217–1223. doi: 10.1136/GUT.2004.059998.
- Andersson, U., Yang, H. and Harris, H. (2018) 'Expert Opinion on Therapeutic Targets Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(3), pp. 263–277. doi: 10.1080/14728222.2018.1439924.
- Aparicio-Domingo, P. *et al.* (2020) 'Fibroblast-derived IL-33 is dispensable for lymph node homeostasis but critical for CD8 T-cell responses to acute and chronic viral infection', *European Journal of Immunology*, n/a(n/a), pp. 1–15. doi: 10.1002/eji.201948413.
- Araya, R. E. *et al.* (2014) 'Intraluminal administration of poly I:C causes an enteropathy that is exacerbated by administration of oral dietary antigen', *PLoS ONE*, 9(6), p. e99236. doi: 10.1371/journal.pone.0099236.
- Araya, R. E. *et al.* (2016) 'Mechanisms of innate immune activation by gluten peptide p31-43 in mice', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(1), pp. G40–G49. doi: 10.1152/ajpgi.00435.2015.
- Arend, W. P. (1991) 'Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family.', *Journal of Clinical Investigation*, 88(5), p. 1445. doi: 10.1172/JCI115453.
- Aronsson, C. A. *et al.* (2015) 'Age at gluten introduction and risk of celiac disease', *Pediatrics*, 135(2), pp. 239–245. doi: 10.1542/peds.2014-1787.
- Arshad, M. I. *et al.* (2013) 'Pathogenic Mouse Hepatitis Virus or Poly(I:C) Induce IL-33 in Hepatocytes in Murine Models of Hepatitis', *PLoS ONE*. Edited by M. Leite de Moraes, 8(9), p. e74278. doi: 10.1371/journal.pone.0074278.

- Arshad, T. *et al.* (2020) 'A Double Edged Sword Role of Interleukin-22 in Wound Healing and Tissue Regeneration', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 2148. doi: 10.3389/fimmu.2020.02148.
- Asadikaram, G. *et al.* (2017) 'Interferon- β 1a Modulates Expression of RAGE but Not S100A12 and Nuclear Factor- κ B in Multiple Sclerosis Patients', *NeuroImmunoModulation*, 23(5–6), pp. 345–351. doi: 10.1159/000464136.
- Axelrod, H. and Pienta, K. J. (2014) 'Axl as a mediator of cellular growth and survival', *Oncotarget*, 5(19), pp. 8818–8852. doi: 10.18632/oncotarget.2422.
- Badarau, E., Collighan, R. J. and Griffin, M. (2013) 'Recent advances in the development of tissue transglutaminase (TG2) inhibitors', *Amino Acids*, 44(1), pp. 119–127. doi: 10.1007/s00726-011-1188-4.
- Bakker, O. B. *et al.* (2021) 'Potential impact of celiac disease genetic risk factors on T cell receptor signaling in gluten - specific CD4 + T cells', *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-021-86612-5.
- Bakshi, A. *et al.* (2012) 'Emerging Therapeutic Options for Celiac Disease: Potential Alternatives to a Gluten-Free Diet', *Gastroenterology & Hepatology*, 8(9), p. 582. Available at: /pmc/articles/PMC3594957/ (Accessed: 11 November 2021).
- Ballantine, L. *et al.* (2015) 'Increased soluble phagocytic receptors sMer, sTyro3 and sAxl and reduced phagocytosis in Juvenile-onset Systemic Lupus Erythematosus', *Pediatric Rheumatology*, 13(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12969-015-0007-y.
- Bansal, G. *et al.* (2013) 'IL-22 activates oxidant signaling in pulmonary vascular smooth muscle cells', *Cellular Signalling*, 25(12), pp. 2727–2733. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.09.001.
- Barone, M. V. *et al.* (2010) 'Gliadin peptide P31–43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation', *PLoS ONE*, 5(8). doi: 10.1371/journal.pone.0012246.
- Barone, M. V. and Zimmer, K. P. (2016) 'Endocytosis and transcytosis of gliadin peptides', *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), p. 8. doi: 10.1186/s40348-015-0029-z.
- Bartoloni, E. *et al.* (2019) 'Celiac Disease Prevalence is Increased in Primary Sjögren's Syndrome and Diffuse Systemic Sclerosis: Lessons from a Large Multi-Center Study', *Journal of clinical medicine*, 8(4). doi: 10.3390/JCM8040540.
- Batchu, N. *et al.* (2016) 'Role of Axl in T-Lymphocyte Survival in Salt-Dependent Hypertension', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(8), pp. 1638–1646. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307848.
- Baumann, C., Bonilla, W. V. *et al.* (2015) 'directly promotes antiviral Th1 cell responses'. doi: 10.1073/pnas.1418549112.
- Baumann, C., Bonilla, W. V., *et al.* (2015) 'T-bet- And STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13), pp. 4056–4061. doi: 10.1073/pnas.1418549112.
- Baumann, C. *et al.* (2019) 'Memory CD8+ T cell protection from viral reinfection depends on interleukin-33 alarmin signals', *Frontiers in Immunology*, 10(AUG). doi: 10.3389/fimmu.2019.01833.
- Bayardo, M. *et al.* (2012) 'Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- γ and tumour necrosis factor- α in human small intestine', *Clinical and Experimental Immunology*, 168(1), pp. 95–104. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04545.x.
- Beecham, A. H. *et al.* (2013) 'Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis', *Nature Genetics*, 45(11), pp. 1353–1362. doi: 10.1038/ng.2770.
- Bell, C. W. *et al.* (2006) 'The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291(6), pp. 1318–1325. doi: 10.1152/AJPCELL.00616.2005/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00120649970005.JPEG.
- Ben-Sasson, S. Z. *et al.* (2009) 'IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), pp. 7119–7124. doi: 10.1073/PNAS.0902745106.
- Benahmed, M. *et al.* (2007) 'Inhibition of TGF- β Signaling by IL-15: A New Role for IL-15 in the Loss of Immune Homeostasis in Celiac Disease', *Gastroenterology*, 132(3), pp. 994–1008. doi:

10.1053/j.gastro.2006.12.025.

Benzakour, O. and Kanthou, C. (2000) 'The anticoagulant factor, protein S, is produced by cultured human vascular smooth muscle cells and its expression is up-regulated by thrombin', *Blood*, 95(6), pp. 2008–2014. doi: 10.1182/blood.v95.6.2008.

Berenson, L. S. *et al.* (2006) 'Distinct Characteristics of Murine STAT4 Activation in Response to IL-12 and IFN- α ', *The Journal of Immunology*, 177(8), pp. 5195–5203. doi: 10.4049/jimmunol.177.8.5195.

Bermejo, D. A. *et al.* (2013) 'Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells', *Nature Immunology*, 14(5), pp. 514–522. doi: 10.1038/ni.2569.

Bernabei, P. *et al.* (2001) 'Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death', *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), pp. 950–960. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739558>.

Bernard, O. *et al.* (2018) 'Pyroptosis Is a Novel Mechanism of IL-33 Release from Airway Epithelial Cells', in *D54. INTERPLAY OF DIVERSE CELLULAR AND MOLECULAR PATHWAYS IN ASTHMA AND AIRWAY DISEASE*. American Thoracic Society (American Thoracic Society International Conference Abstracts), pp. A7799–A7799. Available at: https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2018.197.1_MeetingAbstracts.A7799.

Bernardo, D. *et al.* (2008) 'Higher constitutive IL15R α expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients', *Clinical and Experimental Immunology*, 154(1), pp. 64–73. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03743.x.

Bethune, M. T. *et al.* (2008) 'A non-human primate model for gluten sensitivity', *PloS One*, 3(2), p. e1614. doi: 10.1371/journal.pone.0001614.

Bethune, M. T. *et al.* (2009) 'Interferon- γ Released by Gluten-Stimulated Celiac Disease-Specific Intestinal T Cells Enhances the Transepithelial Flux of Gluten Peptides', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(2), pp. 657–668. doi: 10.1124/jpet.108.148007.

Bethune, M. T. and Khosla, C. (2012) 'Oral Enzyme Therapy for Celiac Sprue', *Methods in Enzymology*, 502, pp. 241–271. doi: 10.1016/B978-0-12-416039-2.00013-6.

Bhat, P. *et al.* (2017) 'Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity', *Cell death & disease*, 8(6), p. e2836. doi: 10.1038/cddis.2017.67.

Bhushal, S. *et al.* (2017) 'Cell polarization and epigenetic status shape the heterogeneous response to type III interferons in intestinal epithelial cells', *Frontiers in Immunology*, 8(JUN), p. 671. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00671/BIBTEX.

Bianchi, M. E. (2007) 'DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger', *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), pp. 1–5. doi: 10.1189/jlb.0306164.

Bodd, M. *et al.* (2010) 'HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22', *Mucosal Immunology*, 3(6), pp. 594–601. doi: 10.1038/mi.2010.36.

Bondar, C. *et al.* (2014) 'Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease', *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0089068.

Bonilla, W. V., Fröhlich, A., *et al.* (2012) 'The Alarmin Interleukin-33 Drives', *Science*, 335(February), pp. 984–989. doi: 10.1126/science.1215418.

Bonilla, W. V., Frohlich, A., *et al.* (2012) 'The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses', *Science*, 335(6071), pp. 984–989. doi: 10.1126/science.1215418.

Bosurgi, L. *et al.* (2013) 'Paradoxical role of the proto-oncogene Axl and Mer receptor tyrosine kinases in colon cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), pp. 13091–13096. doi: 10.1073/pnas.1302507110.

Bosurgi, L. *et al.* (2017) 'Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells', *Science (New York, N.Y.)*, 356(6342), p. 1072. doi: 10.1126/SCIENCE.AAI8132.

Boteanu, R. M. *et al.* (2017) 'Alarmins in chronic noncommunicable diseases: Atherosclerosis, diabetes and cancer', *Journal of Proteomics*, 153, pp. 21–29. doi: 10.1016/j.jprot.2016.11.006.

- Bouziat, R. *et al.* (2017) 'Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease', *Science*, 356(6333), pp. 44–50. doi: 10.1126/science.aah5298.
- Brault, M. *et al.* (2018) 'Intracellular Nucleic Acid Sensing Triggers Necroptosis through Synergistic Type I IFN and TNF Signaling', *The Journal of Immunology*, 200(8), pp. 2748–2756. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1701492/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Braverman, J. *et al.* (2016) 'HIF-1 α Is an Essential Mediator of IFN- γ -Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis', *The Journal of Immunology*, 197(4), pp. 1287–1297. doi: 10.4049/jimmunol.1600266.
- Brenne, A. T. *et al.* (2002) 'Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells', *Blood*, 99(10), pp. 3756–3762. doi: 10.1182/blood.V99.10.3756.
- Brown, J. J., Jabri, B. and Dermody, T. S. (2018) 'A viral trigger for celiac disease', *PLOS Pathogens*, 14(9), p. e1007181. doi: 10.1371/journal.ppat.1007181.
- Bruewer, M. *et al.* (2005) 'Interferon- γ induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process', *The FASEB Journal*, 19(8), pp. 923–933. doi: 10.1096/fj.04-3260com.
- Budda, S. A. *et al.* (2016) 'Transcription Factor HIF-1 α Controls Expression of the Cytokine IL-22 in CD4 T Cells', *The Journal of Immunology*, 197(7), pp. 2646–2652. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1600250/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Cabezón, R. *et al.* (2015) 'MERTK as negative regulator of human T cell activation', *Journal of Leukocyte Biology*, 97(4), pp. 751–760. doi: 10.1189/jlb.3A0714-334R.
- Calvanese, L. *et al.* (2019) 'Structural insights on P31-43, a gliadin peptide able to promote an innate but not an adaptive response in celiac disease', *Journal of Peptide Science*, 25(5), p. e3161. doi: 10.1002/PSC.3161.
- Camarca, A. *et al.* (2009) 'Intestinal T Cell Responses to Gluten Peptides Are Largely Heterogeneous: Implications for a Peptide-Based Therapy in Celiac Disease', *The Journal of Immunology*, 182(7), pp. 4158–4166. doi: 10.4049/jimmunol.0803181.
- Caminero, A. *et al.* (2014) *Gluten Metabolism in Humans. Involvement of the Gut Microbiota., Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-401716-0.00013-1.
- Caminero, A. *et al.* (2016) 'Duodenal Bacteria From Patients With Celiac Disease and Healthy Subjects Distinctly Affect Gluten Breakdown and Immunogenicity', *Gastroenterology*, 151(4), pp. 670–683. doi: 10.1053/j.gastro.2016.06.041.
- Caminero, A., McCarville, J. L., *et al.* (2019) 'Duodenal bacterial proteolytic activity determines sensitivity to dietary antigen through protease-activated receptor-2', *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41467-019-09037-9.
- Caminero, A., Meisel, M., *et al.* (2019) 'Mechanisms by which gut microorganisms influence food sensitivities', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(1), pp. 7–18. doi: 10.1038/s41575-018-0064-z.
- Canova, C. *et al.* (2014) 'Association of maternal education, early infections, and antibiotic use with celiac disease: a population-based birth cohort study in northeastern Italy', *American journal of epidemiology*, 180(1), pp. 76–85. doi: 10.1093/AJE/KWU101.
- Capozzi, A. *et al.* (2013) 'Modulatory Effect of Gliadin Peptide 10-mer on Epithelial Intestinal CACO-2 Cell Inflammatory Response', *PloS one*, 8(6). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0066561.
- Caprioli, F. *et al.* (2008) 'Autocrine Regulation of IL-21 Production in Human T Lymphocytes', *The Journal of Immunology*, 180(3), pp. 1800–1807. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1800.
- Capuano, M. *et al.* (2011) 'MicroRNA-449a overexpression, reduced NOTCH1 signals and scarce goblet cells characterize the small intestine of celiac patients', *PLoS ONE*, 6(12). doi: 10.1371/journal.pone.0029094.
- Caputo, I. *et al.* (2012) 'Gliadin Peptides Induce Tissue Transglutaminase Activation and ER-Stress through Ca²⁺ Mobilization in Caco-2 Cells', *PLOS ONE*, 7(9), p. e45209. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0045209.
- Carrera Silva, E. A. *et al.* (2013) 'T Cell-Derived Protein S Engages TAM Receptor Signaling in Dendritic

- Cells to Control the Magnitude of the Immune Response', *Immunity*, 39(1), pp. 160–170. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.010.
- Carroccio, A. *et al.* (2012) 'Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: Exploring a new clinical entity', *American Journal of Gastroenterology*, 107(12), pp. 1898–1906. doi: 10.1038/ajg.2012.236.
- Carruth, L. M., Demczuk, S. and Mizel, S. B. (1991) 'Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor', *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), pp. 12162–12167. doi: 10.1016/S0021-9258(18)98874-5.
- Casella, G. *et al.* (2016) 'Association between celiac disease and chronic hepatitis C', *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 9(3), p. 153. doi: 10.22037/ghfbb.v0i0.971.
- Casella, G. *et al.* (2018) 'Non celiac gluten sensitivity and diagnostic challenges', (5).
- Castellanos-Rubio, A. *et al.* (2016) 'A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease', *Science*, 352(6281), pp. 91–95. doi: 10.1126/science.aad0467.
- Cataldo, F. *et al.* (2003) 'Plasma cytokine profiles in patients with celiac disease and selective IgA deficiency', *Pediatric Allergy and Immunology*, 14(4), pp. 320–324. doi: 10.1034/j.1399-3038.2003.00053.x.
- Catassi, C. *et al.* (2015) 'Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): The salerno experts' criteria', *Nutrients*, 7(6), pp. 4966–4977. doi: 10.3390/nu7064966.
- Cayrol, C. *et al.* (2018) 'Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33', *Nature Immunology* 2018 19:4, 19(4), pp. 375–385. doi: 10.1038/s41590-018-0067-5.
- Chan, J. K. *et al.* (2012) 'Science in medicine Alarmins : awaiting a clinical response', *The Journal of Clinical Investigation*, 122(8), pp. 2711–2719. doi: 10.1172/JCI62423.tification.
- Chan, J. N. E. *et al.* (2020) 'Cell surface IL-1 α trafficking is specifically inhibited by interferon- γ , and associates with the membrane via IL-1R2 and GPI anchors', *European Journal of Immunology*, 50(11), pp. 1663–1675. doi: 10.1002/eji.201948521.
- Chan, P. Y. *et al.* (2016) 'The TAM family receptor tyrosine kinase TYRO3 is a negative regulator of type 2 immunity', *Science*, 352(6281), pp. 99–103. doi: 10.1126/science.aaf1358.
- Chander, A. M. *et al.* (2018) 'Cross-Talk Between Gluten, Intestinal Microbiota and Intestinal Mucosa in Celiac Disease: Recent Advances and Basis of Autoimmunity', *Frontiers in microbiology*, 9(NOV). doi: 10.3389/FMICB.2018.02597.
- Cheravsky, A. C. *et al.* (2002) 'Evidences of the involvement of Bak, a member of the Bcl-2 family of proteins, in active coeliac disease', *Autoimmunity*, 35(1), pp. 29–37. doi: 10.1080/08916930290005945.
- Chirido, F. G. *et al.* (1998) 'Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 33(11), pp. 1186–1192. doi: 10.1080/00365529850172557.
- Chirido, F. G. *et al.* (2021) *The gliadin p31–43 peptide: Inducer of multiple proinflammatory effects*. 1st edn, *International Review of Cell and Molecular Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.10.003.
- Chiu, Y. H., MacMillan, J. B. and Chen, Z. J. (2009) 'RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway', *Cell*, 138(3), pp. 576–591. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.015.
- Choi, Y.-S. Y. S. Y.-S. *et al.* (2009) 'Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production', *Blood*, 114(14), pp. 3117–3126. doi: 10.1182/blood-2009-02-203372.The.
- Chow, M. A. *et al.* (2012) 'Immunoglobulin A deficiency in celiac disease', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(10), pp. 850–854. doi: 10.1097/MCG.0b013e31824b2277.
- Christophersen, A. *et al.* (2019) 'Distinct phenotype of CD4+ T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions', *Nature Medicine*, 25(5), pp. 734–737. doi: 10.1038/s41591-019-0403-9.

- Ciccocioppo, R. *et al.* (2005) 'Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa', *Laboratory Investigation*, 85(3), pp. 397–407. doi: 10.1038/labinvest.3700225.
- Ciccocioppo, R. *et al.* (2006) 'Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease', *American Journal of Clinical Pathology*, 125(4), pp. 502–511. doi: 10.1309/DTYRA91G8R0KTM8M.
- Clemente, M. G. *et al.* (2003) 'Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function', *Gut*, 52(2), pp. 218–223. doi: 10.1136/gut.52.2.218.
- Coccia, E. M. *et al.* (2000) 'IFN- γ and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation', *International Immunology*, 12(7), pp. 977–985. doi: 10.1093/intimm/12.7.977.
- Cohen, E. S. *et al.* (2015) 'Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation', *Nature Communications*, 6(1), p. 8327. doi: 10.1038/ncomms9327.
- Cohen, I. *et al.* (2010) 'Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation', 107(6). doi: 10.1073/pnas.0915018107.
- Cohn, A., Sofia, M. A. and Kupfer, S. S. (2014) 'Type 1 Diabetes and Celiac Disease: Clinical Overlap and New Insights into Disease Pathogenesis', *Current diabetes reports*, 14(8), p. 517. doi: 10.1007/s11892-014-0517-x.
- Commins, S. P. (2015) 'Mechanisms of Oral Tolerance', *Pediatric Clinics of North America*, 62(6), pp. 1523–1529. doi: 10.1016/j.pcl.2015.07.013.
- Cook, L. *et al.* (2017) 'Circulating gluten-specific FOXP3+CD39+ regulatory T cells have impaired suppressive function in patients with celiac disease', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(6), pp. 1592-1603.e8. doi: 10.1016/J.JACI.2017.02.015.
- Cooper, R. *et al.* (2020) 'Counting Intraepithelial Lymphocytes: A Comparison Between Routine Staining and CD3 Immunohistochemistry', *International Journal of Surgical Pathology*, 28(4), pp. 367–370. doi: 10.1177/1066896919894644.
- Corcoran, S. E. and O'Neill, L. A. J. (2016) 'HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation', *Journal of Clinical Investigation*, 126(10), pp. 3699–3707. doi: 10.1172/JCI84431.
- Cornut, M., Bourdonnay, E. and Henry, T. (2020) 'Transcriptional regulation of inflammasomes', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), pp. 1–28. doi: 10.3390/ijms21218087.
- Cuccioloni, M. *et al.* (2016) 'Interaction between wheat alpha-amylase/trypsin bi-functional inhibitor and mammalian digestive enzymes: Kinetic, equilibrium and structural characterization of binding', *Food Chemistry*, 213, pp. 571–578. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.020.
- Czaja-Bulsa, G. and Bulsa, M. (2017) 'What do we know now about IgE-mediated wheat allergy in children?', *Nutrients*, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.3390/nu9010035.
- Czaja-Bulsa, G. and Bulsa, M. (2018) 'Adherence to gluten-free diet in children with celiac disease', *Nutrients*, 10(10), pp. 1–9. doi: 10.3390/nu10101424.
- Dahan, S. *et al.* (2016) 'All disease begins in the gut: Celiac disease co-existence with SLE', *Autoimmunity reviews*, 15(8), pp. 848–853. doi: 10.1016/J.AUTREV.2016.06.003.
- Dai, J. *et al.* (2009) 'IFN- λ 1 (IL-29) inhibits GATA3 expression and suppresses Th2 responses in human naive and memory T cells', *Blood*, 113(23), pp. 5829–5838. doi: 10.1182/blood-2008-09-179507.
- Darnell, J. E., Kerr, I. M. and Stark, G. R. (1994) 'Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins', *Science*, pp. 1415–1421. doi: 10.1126/science.8197455.
- Demyanets, S. *et al.* (2011) 'Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(9), pp. 2080–2089. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.231431.
- Deng, M. *et al.* (2018) 'The Endotoxin Delivery Protein HMGB1 Mediates Caspase-11-Dependent Lethality in Sepsis', *Immunity*, 49(4), pp. 740-753.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2018.08.016.
- Dengler, V. L., Galbraith, M. D. and Espinosa, J. M. (2014) 'Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(1), pp. 1–15. doi:

10.3109/10409238.2013.838205.

Der, S. D. *et al.* (1998) 'Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), pp. 15623–15628. doi: 10.1073/PNAS.95.26.15623.

Dieli-Crimi, R., Cénit, M. C. and Núñez, C. (2015) 'The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications', *Journal of Autoimmunity*, 64, pp. 26–41. doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.003.

Dinarelo, C. A. (2009) 'Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family', <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>, 27, pp. 519–550. doi: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132612.

Diosdado, B. *et al.* (2007) 'Neutrophil Recruitment and Barrier Impairment in Celiac Disease: A Genomic Study', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(5), pp. 574–581. doi: 10.1016/j.cgh.2006.11.014.

Dixon, B. R. E. A. *et al.* (2016) 'IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against *Helicobacter pylori*', *PLoS ONE*, 11(2). doi: 10.1371/journal.pone.0148514.

Dotsenko, V. *et al.* (2021) 'Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Intestinal Mucosa in Celiac Disease Patients on a Gluten-Free Diet and Postgluten Challenge', *Cmgh*, 11(1), pp. 13–32. doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.07.010.

Dray, S. and Josse, J. (2015) 'Principal component analysis with missing values: a comparative survey of methods', *Plant Ecology*, 216(5), pp. 657–667. doi: 10.1007/s11258-014-0406-z.

Drut, R. and Ruia, E. C. (2001) 'The histopathology of pediatric celiac disease: Order must prevail out of chaos', *International Journal of Surgical Pathology*, 9(4), pp. 261–264. doi: 10.1177/106689690100900401.

Duan, L. *et al.* (2013) 'The role of IL-33 in rheumatic diseases', *Clinical and Developmental Immunology*. Edited by J. Zhang, 2013, p. 924363. doi: 10.1155/2013/924363.

Dunne, M. R. *et al.* (2020) 'Coeliac Disease Pathogenesis: The Uncertainties of a Well-Known Immune Mediated Disorder', *Frontiers in Immunology*, 0, p. 1374. doi: 10.3389/FIMMU.2020.01374.

Edwar, E. *et al.* (2019) 'Interleukin-17 and matrix metalloproteinase-9 expression in the mycetoma granuloma', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), p. e0007351. doi: 10.1371/journal.pntd.0007351.

Egaña-Gorroño, L. *et al.* (2020) 'Receptor for advanced glycation end products (Rage) and mechanisms and therapeutic opportunities in diabetes and cardiovascular disease: Insights from human subjects and animal models', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Frontiers Media S.A., p. 37. doi: 10.3389/fcvm.2020.00037.

Egwuagu, C. E. *et al.* (2002) 'Suppressors of Cytokine Signaling Proteins Are Differentially Expressed in Th1 and Th2 Cells: Implications for Th Cell Lineage Commitment and Maintenance', *The Journal of Immunology*, 168(7), pp. 3181–3187. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3181.

Egwuagu, C. E. *et al.* (2006) 'Interferon- γ induces regression of epithelial cell carcinoma: Critical roles of IRF-1 and ICSP transcription factors', *Oncogene*, 25(26), pp. 3670–3679. doi: 10.1038/sj.onc.1209402.

Ekman, C., Stenhoff, J. and Dahlbäck, B. (2010) 'Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(4), pp. 838–844. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03752.x.

Esposito, C. *et al.* (2003) 'Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease', *The American journal of gastroenterology*, 98(8), pp. 1813–1820. doi: 10.1111/J.1572-0241.2003.07582.X.

Ettinger, R. *et al.* (2005) 'IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells', *The Journal of Immunology*, 175(12), pp. 7867–7879. doi: 10.4049/JIMMUNOL.175.12.7867.

Eyerich, K., Dimartino, V. and Cavani, A. (2017) 'IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology', *European Journal of Immunology*, 47(4), pp. 607–614. doi: 10.1002/eji.201646723.

Fais, S. *et al.* (1992) 'Gliadin induced changes in the expression of MHC-class II antigens by human small intestinal epithelium. Organ culture studies with coeliac disease mucosa', *Gut*, 33(4), pp. 472–475. doi:

10.1136/gut.33.4.472.

Falcigno, L. *et al.* (2020) 'Structural perspective of gliadin peptides active in celiac disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), pp. 1–21. doi: 10.3390/ijms21239301.

Feighery, C. *et al.* (2003) 'TNF- α Production by Intraepithelial T Cells in Celiac Disease [8] (multiple letter)', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, pp. 1560–1561. doi: 10.1016/j.gastro.2003.03.007.

Ferguson, B. J. *et al.* (2012) 'DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity', *eLife*, 2012(1). doi: 10.7554/eLife.00047.

Fernández, S. *et al.* (2011) 'Characterization of gliadin-specific Th17 cells from the mucosa of celiac disease patients', *American Journal of Gastroenterology*, 106(3), pp. 528–538. doi: 10.1038/ajg.2010.465.

Ferranti, P. *et al.* (2007) 'Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease', *Journal of mass spectrometry: JMS*, 42(12), pp. 1531–1548. doi: 10.1002/JMS.1361.

Fina, D. *et al.* (2008) 'Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease.', *Gut*, 57(7), pp. 887–892. doi: 10.1136/gut.2007.129882.

Finethy, R. *et al.* (2015) 'Guanylate binding proteins enable rapid activation of canonical and noncanonical inflammasomes in Chlamydia-infected macrophages', *Infection and Immunity*, 83(12), pp. 4740–4749. doi: 10.1128/IAI.00856-15.

Flodström, M. and Eizirik, D. L. (1997) 'Interferon- γ -induced interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression in rodent and human islet cells precedes nitric oxide production', *Endocrinology*, 138(7), pp. 2747–2753. doi: 10.1210/endo.138.7.5286.

Fluhr, H. *et al.* (2007) 'Interferon- γ and tumor necrosis factor- α sensitize primarily resistant human endometrial stromal cells to Fas-mediated apoptosis', *Journal of Cell Science*, 120(23), pp. 4126–4133. doi: 10.1242/jcs.009761.

Forsberg, T. E. *et al.* (2002) 'Paradoxical Coexpression of Proinflammatory and Down-regulatory Cytokines in Intestinal T Cells', pp. 667–678. doi: 10.1053/gast.2002.35355.

Forsythe, J. A. *et al.* (1996) 'Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.', *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), pp. 4604–4613. doi: 10.1128/mcb.16.9.4604.

Fourgeaud, L. *et al.* (2016) 'TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology', *Nature*, 532(7598), pp. 240–244. doi: 10.1038/nature17630.

François-Newton, V. *et al.* (2011) 'USP18-Based Negative Feedback Control Is Induced by Type I and Type III Interferons and Specifically Inactivates Interferon α Response', *PLOS ONE*, 6(7), p. e22200. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0022200.

Freeman, H. J. (2017) 'Dietary compliance in celiac disease', *World Journal of Gastroenterology*, 23(15), p. 2635. doi: 10.3748/WJG.V23.I15.2635.

Freigang, S. *et al.* (2013) 'Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 α and sterile vascular inflammation in atherosclerosis', *Nature Immunology*, 14(10), pp. 1045–1053. doi: 10.1038/ni.2704.

Fröhlich, A. *et al.* (2009) 'IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection', *Science*, 324(5934), pp. 1576–1580. doi: 10.1126/science.1172815.

Frossi, B. *et al.* (2017) 'Mast cells are associated with the onset and progression of celiac disease', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(4), pp. 1266–1274.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.011.

Fuchs, A. *et al.* (2013) 'Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of il-12- and il-15-responsive ifn- γ -producing cells', *Immunity*, 38(4), pp. 769–781. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.010.

Fujino, N. *et al.* (2019) 'Sensing of apoptotic cells through Axl causes lung basal cell proliferation in inflammatory diseases', *Journal of Experimental Medicine*, 216(9), pp. 2184–2201. doi: 10.1084/jem.20171978.

Gaffen, S. L. *et al.* (2014) 'The IL-23-IL-17 immune axis: From mechanisms to therapeutic testing', *Nature Reviews Immunology*, 14(9), pp. 585–600. doi: 10.1038/nri3707.

Gajewski, T. F. and Fitch, F. W. (1988) 'Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones.', *The Journal*

of *Immunology*, 140(12).

Gao, X. *et al.* (2015) ‘Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8⁺ T and NK Cells’, *The Journal of Immunology*, 194(1), pp. 438–445. doi: 10.4049/jimmunol.1401344.

García-Santisteban, I. *et al.* (2021) *Celiac disease susceptibility: The genome and beyond*. 1st edn, *International Review of Cell and Molecular Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.10.002.

Garden, O. A. *et al.* (2000) ‘Inheritance of gluten-sensitive enteropathy in Irish Setters’, *American Journal of Veterinary Research*, 61(4), pp. 462–468. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.462.

Ge, D. and You, Z. (2008) ‘Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissues’, *International Archives of Medicine*, 1(1), p. 19. doi: 10.1186/1755-7682-1-19.

Ge, S. *et al.* (2014) ‘Interleukin 17 receptor A modulates monocyte subsets and macrophage generation in vivo’, *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0085461.

Gebert, A. *et al.* (2004) ‘Antigen Transport into Peyer’s Patches : Increased Uptake by Constant Numbers of M Cells’, *The American Journal of Pathology*, 164(1), p. 65. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63097-0.

Gianfrani, C. *et al.* (2006) ‘Gliadin-Specific Type 1 Regulatory T Cells from the Intestinal Mucosa of Treated Celiac Patients Inhibit Pathogenic T Cells’, *The Journal of Immunology*, 177(6), pp. 4178–4186. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.4178.

Gianfrani, C. *et al.* (2015) ‘Extensive in vitro gastrointestinal digestion markedly reduces the immunotoxicity of Triticum monococcum wheat: Implication for celiac disease’, *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(9), pp. 1844–1854. doi: 10.1002/MNFR.201500126.

Gómez Castro, M. F. *et al.* (2019) ‘p31-43 Gliadin Peptide Forms Oligomers and Induces NLRP3 Inflammasome/Caspase 1- Dependent Mucosal Damage in Small Intestine’, *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), p. 31. doi: 10.3389/fimmu.2019.00031.

González-Navajas, J. M. *et al.* (2012) ‘Immunomodulatory functions of type I interferons’, *Nature Reviews Immunology*, 12(2), pp. 125–135. doi: 10.1038/nri3133.

Goodwin, G. H., Sanders, C. and Johns, E. W. (1973) ‘A New Group of Chromatin-Associated Proteins with a High Content of Acidic and Basic Amino Acids’, *European Journal of Biochemistry*, 38(1), pp. 14–19. doi: 10.1111/J.1432-1033.1973.TB03026.X.

Goruppi, S. *et al.* (1997) *The product of a gas6 splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation*, *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01093-4.

Gough, D. J. *et al.* (2010) ‘Functional Crosstalk between Type I and II Interferon through the Regulated Expression of STAT1’, *PLOS Biology*, 8(4), p. e1000361. doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1000361.

Graham, D. S. *et al.* (2011) ‘Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus’, *PLoS Genetics*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pgen.1002341.

Gu, C., Wu, L. and Li, X. (2013) ‘IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling’, *Cytokine*, 64(2), pp. 477–485. doi: 10.1016/j.cyto.2013.07.022.

Guo, M. *et al.* (2019) ‘IFN regulatory factor 1 mediates macrophage pyroptosis induced by oxidized low-density lipoprotein in patients with acute coronary syndrome’, *Mediators of Inflammation*, 2019. doi: 10.1155/2019/2917128.

Gustafson, K. S. and Ginder, G. D. (1996) ‘Interferon- γ induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1 α to a distinct interferon- γ - responsive element’, *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), pp. 20035–20046. doi: 10.1074/jbc.271.33.20035.

Gutiérrez, S. *et al.* (2017) ‘The human digestive tract has proteases capable of gluten hydrolysis’, *Molecular Metabolism*, 6(7), pp. 693–702. doi: 10.1016/j.molmet.2017.05.008.

Hagn, M. *et al.* (2014) ‘B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21’, *International Immunology*, 26(7), pp. 383–395. doi: 10.1093/intimm/dxu001.

- Hall, A. J., Peake, I. R. and Winship, P. R. (2006) 'Regulation of the human protein S gene promoter by liver enriched transcription factors', *British Journal of Haematology*, 135(4), pp. 538–546. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06327.x.
- Hamilton, N. H. R. *et al.* (2002) 'IFN- γ Regulates Murine Interferon-Inducible T Cell Alpha Chemokine (I-TAC) Expression in Dendritic Cell Lines and during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)', *Scandinavian Journal of Immunology*, 55(2), pp. 171–177. doi: 10.1046/j.1365-3083.1997.d01-93.x.
- Hansson, T. *et al.* (2002) 'Transforming growth factor- β (TGF- β) and tissue transglutaminase expression in the small intestine in children with coeliac disease', *Scandinavian Journal of Immunology*, 56(5), pp. 530–537. doi: 10.1046/j.1365-3083.2002.01157.x.
- Harper, E. G. *et al.* (2010) 'NIH Public Access', 129(9), pp. 2175–2183. doi: 10.1038/jid.2009.65.Th17.
- Harris, H. E., Andersson, U. and Pisetsky, D. S. (2012) 'HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease', *Nature Reviews Rheumatology*, 8(4), pp. 195–202. doi: 10.1038/nrrheum.2011.222.
- Harris, K. M., Fasano, A. and Mann, D. L. (2008) 'Cutting Edge: IL-1 Controls the IL-23 Response Induced by Gliadin, the Etiologic Agent in Celiac Disease', *The Journal of Immunology*, 181(7), pp. 4457–4460. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4457.
- Harris, K. M., Fasano, A. and Mann, D. L. (2010) 'Monocytes differentiated with IL-15 support Th17 and Th1 responses to wheat gliadin: Implications for celiac disease', *Clinical Immunology*, 135(3), pp. 430–439. doi: 10.1016/j.clim.2010.01.003.
- Hattori, T. *et al.* (2015) 'Gene Expression Profiling of IL-17A-Treated Synovial Fibroblasts from the Human Temporomandibular Joint', *Mediators of Inflammation*, 2015. doi: 10.1155/2015/436067.
- He, X. S. *et al.* (2010) 'Differential Transcriptional Responses to Interferon- α and Interferon- γ in Primary Human Hepatocytes', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 30(5), p. 311. doi: 10.1089/JIR.2009.0082.
- Hirota, K. *et al.* (2011) 'Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses', *Nature Immunology*, 12(3), pp. 255–263. doi: 10.1038/ni.1993.
- Hnida, K. *et al.* (2016) 'Epitope-dependent functional effects of celiac disease autoantibodies on transglutaminase 2', *Journal of Biological Chemistry*, 291(49), pp. 25542–25552. doi: 10.1074/jbc.M116.738161.
- Hodny, Z. *et al.* (2015) 'Interferon gamma/NADPH oxidase defense system in immunity and cancer', *Oncoimmunology*, 5(2), pp. 1–3. doi: 10.1080/2162402X.2015.1080416.
- Honda, K. and Taniguchi, T. (2006) 'IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors', *Nature Reviews Immunology*, 6(9), pp. 644–658. doi: 10.1038/nri1900.
- Høydahl, L. S. *et al.* (2019) 'Plasma Cells Are the Most Abundant Gluten Peptide MHC-expressing Cells in Inflamed Intestinal Tissues From Patients With Celiac Disease', *Gastroenterology*, 156(5), pp. 1428–1439.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.013.
- Huang, W. *et al.* (2016) 'High-mobility group box 1 impairs airway epithelial barrier function through the activation of the RAGE/ERK pathway', *International Journal of Molecular Medicine*, 37(5), pp. 1189–1198. doi: 10.3892/ijmm.2016.2537.
- Huang, W. C. *et al.* (2012) 'Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- κ B', *PLoS ONE*, 7(8), p. e42507. doi: 10.1371/journal.pone.0042507.
- Huber, M. *et al.* (2008) 'IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), pp. 20846–20851. doi: 10.1073/pnas.0809077106.
- Hurgin, V. *et al.* (2007) 'Antiviral and immunoregulatory activities of IFN- γ depend on constitutively expressed IL-1 α ', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), pp. 5044–5049. doi: 10.1073/PNAS.0611608104.

- Husby, S., Murray, J. A. and Katzka, D. A. (2019) 'AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease-Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review', *Gastroenterology*, 156(4), pp. 885–889. doi: 10.1053/J.GASTRO.2018.12.010.
- Iqbal, T. *et al.* (2013) 'Celiac disease arthropathy and autoimmunity study', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 28(1), pp. 99–105. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07272.x.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) 'Virus interference. I. The interferon', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 147(927), pp. 258–267. doi: 10.1098/rspb.1957.0048.
- Islam, M. S. *et al.* (2016) 'Epidermal growth factor is a critical regulator of the cytokine IL-33 in intestinal epithelial cells', *British journal of pharmacology*, 173(16), pp. 2532–2542. doi: 10.1111/BPH.13535.
- Ivarsson, A. *et al.* (2002) 'Breast-feeding protects against celiac disease', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), pp. 914–921. doi: 10.1093/AJCN/75.5.914.
- Iversen, R. *et al.* (2020) 'Evidence That Pathogenic Transglutaminase 2 in Celiac Disease Derives From Enterocytes', *Gastroenterology*, 159(2), pp. 788–790. doi: 10.1053/j.gastro.2020.04.018.
- Jabri, B. *et al.* (2000) 'Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E- specific natural killer receptor CD94 in celiac disease', *Gastroenterology*, 118(5), pp. 867–879. doi: 10.1016/S0016-5085(00)70173-9.
- Jabri, B. and Sollid, L. M. (2006) 'Mechanisms of Disease : immunopathogenesis of celiac disease', 3(9), pp. 516–525. doi: 10.1038/ncpgasthep0582.
- Jabri, B. and Sollid, L. M. (2017) 'T Cells in Celiac Disease', *The Journal of Immunology*, 198(8), pp. 3005–3014. doi: 10.4049/jimmunol.1601693.
- Jahnke, A. and Johnson, J. P. (1995) 'Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) is Synergistically Activated by TNF- α and IFN- γ Responsive Sites', *Immunobiology*, 193(2–4), pp. 305–314. doi: 10.1016/S0171-2985(11)80559-0.
- Jarry, A. *et al.* (2017) 'Interferon-Alpha Promotes Th1 Response and Epithelial Apoptosis via Inflammasome Activation in Human Intestinal Mucosa', *Cmgh*, 3(1), pp. 72–81. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.09.007.
- Jefferies, C. A. (2019) 'Regulating IRFs in IFN driven disease', *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2019.00325.
- Jin, X. *et al.* (2011) 'Activation of extracellular transglutaminase 2 by thioredoxin', *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), pp. 37866–37873. doi: 10.1074/jbc.M111.287490.
- Jordan, W. J. *et al.* (2007) 'Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN- λ 1/IL-29)', *Genes and Immunity*, 8(1), pp. 13–20. doi: 10.1038/sj.gene.6364348.
- Junker, Y. *et al.* (2012) 'Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4', *Journal of Experimental Medicine*, 209(13), pp. 2395–2408. doi: 10.1084/jem.20102660.
- Al Kafri, N. and Hafizi, S. (2020) 'Galectin-3 Stimulates Tyro3 Receptor Tyrosine Kinase and Erk Signalling, Cell Survival and Migration in Human Cancer Cells', *Biomolecules*, 10(7), p. 1035. doi: 10.3390/biom10071035.
- Kagnoff, M. F. *et al.* (1984) 'Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease.', *The Journal of Experimental Medicine*, 160(5), pp. 1544–1557. doi: 10.1084/jem.160.5.1544.
- Kakkar, R. *et al.* (2012) 'Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells', *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), pp. 6941–6948. doi: 10.1074/jbc.M111.298703.
- Kallies, A. and Good-Jacobson, K. L. (2017) 'Transcription Factor T-bet Orchestrates Lineage Development and Function in the Immune System', *Trends in Immunology*, 38(4), pp. 287–297. doi: 10.1016/j.it.2017.02.003.
- Karshovska, E. *et al.* (2019) 'HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) promotes macrophage necroptosis by regulating miR-210 and miR-383', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(3), pp. 583–596. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313290.
- Kazama, H. *et al.* (2008) 'Induction of Immunological Tolerance by Apoptotic Cells Requires Caspase-

- Dependent Oxidation of High-Mobility Group Box-1 Protein', *Immunity*, 29(1), pp. 21–32. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2008.05.013/ATTACHMENT/689EE3CB-E22F-4013-9728-2751F490DF8F/MMC1.PDF.
- Keir, M. E. *et al.* (2020) 'The role of IL-22 in intestinal health and disease', *Journal of Experimental Medicine*, 217(3), pp. 1–9. doi: 10.1084/jem_20192195.
- Kelsall, B. L. (2019) *Mucosal antigen sampling across the villus epithelium by epithelial and myeloid cells, Mucosal Vaccines: Innovation for Preventing Infectious Diseases*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811924-2.00003-1.
- Ketelut-Carneiro, N. *et al.* (2019) 'Caspase-11-dependent IL-1 α release boosts Th17 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis*', *PLoS Pathogens*, 15(8), p. e1007990. doi: 10.1371/journal.ppat.1007990.
- Kierdorf, K. and Fritz, G. (2013) 'RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond', *Journal of Leukocyte Biology*, 94(1), pp. 55–68. doi: 10.1189/jlb.1012519.
- Kiesslich, R. *et al.* (2007) 'Identification of Epithelial Gaps in Human Small and Large Intestine by Confocal Endomicroscopy', *Gastroenterology*, 133(6), pp. 1769–1778. doi: 10.1053/j.gastro.2007.09.011.
- Kim, B. *et al.* (2013) 'The interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines', *Frontiers in Immunology*, 4(NOV), pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2013.00391.
- Kim, C. Y. *et al.* (2004) 'Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), p. 4175. doi: 10.1073/PNAS.0306885101.
- Kim, S. M. *et al.* (2019) 'Axl is a key regulator of intestinal $\gamma\delta$ T-cell homeostasis', *The FASEB Journal*, 33(12), pp. 13386–13397. doi: 10.1096/FJ.201901356R.
- Kim, Y. H. *et al.* (2020) 'Secretory autophagy machinery and vesicular trafficking are involved in HMGB1 secretion', *Autophagy*, pp. 1–18. doi: 10.1080/15548627.2020.1826690.
- Kinugasa, T. *et al.* (2000) 'Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators', *Gastroenterology*, 118(6), pp. 1001–1011. doi: 10.1016/S0016-5085(00)70351-9.
- Klöck, C., DiRaimondo, T. R. and Khosla, C. (2012) 'Role of transglutaminase 2 in celiac disease pathogenesis', *Seminars in Immunopathology*, 34(4), pp. 513–522. doi: 10.1007/s00281-012-0305-0.
- Knuth, A. K. *et al.* (2019) 'Interferons Transcriptionally Up-Regulate MLKL Expression in Cancer Cells', *Neoplasia (United States)*, 21(1), pp. 74–81. doi: 10.1016/j.neo.2018.11.002.
- Kokkola, R. *et al.* (2005) 'RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages', *Scandinavian Journal of Immunology*, 61(1), pp. 1–9. doi: 10.1111/j.0300-9475.2005.01534.x.
- Komai-Koma, M. *et al.* (2011) 'IL-33 Activates B1 Cells and Exacerbates Contact Sensitivity', *The Journal of Immunology*, 186(4), pp. 2584–2591. doi: 10.4049/jimmunol.1002103.
- Kopitar-Jerala, N. (2017) 'The role of interferons in inflammation and inflammasome activation', *Frontiers in Immunology*, 8(JUL). doi: 10.3389/fimmu.2017.00873.
- Kotenko, S. V. *et al.* (2003) 'IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex', *Nature Immunology*. Nat Immunol, pp. 69–77. doi: 10.1038/ni875.
- Kotredes, K. P. and Gamero, A. M. (2013) 'Interferons as inducers of apoptosis in malignant cells', *Journal of Interferon and Cytokine Research*. Mary Ann Liebert, Inc., pp. 162–170. doi: 10.1089/jir.2012.0110.
- Krug, S. M., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2014) 'Tight junction, selective permeability, and related diseases', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, pp. 166–176. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2014.09.002.
- Kudo, F. *et al.* (2016) 'Interferon- γ constrains cytokine production of group 2 innate lymphoid cells', *Immunology*, 147(1), pp. 21–29. doi: 10.1111/imm.12537.
- Kuja-Halkola, R. *et al.* (2016) 'Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: a population-based study in 107 000 twins', *Gut*, 65(11), pp. 1793–1798. doi: 10.1136/GUTJNL-2016-311713.
- Kulkarni, D. H. *et al.* (2019) 'Goblet cell associated antigen passages support the induction and maintenance of oral tolerance', *Mucosal Immunology* 2019 13:2, 13(2), pp. 271–282. doi: 10.1038/s41385-

019-0240-7.

Kumar, P. J. *et al.* (1979) 'Reintroduction of gluten in adults and children with treated coeliac disease.', *Gut*, 20(9), p. 743. doi: 10.1136/GUT.20.9.743.

Kumar, S. *et al.* (2014) 'Transglutaminase 2 reprogramming of glucose metabolism in mammary epithelial cells via activation of inflammatory signaling pathways', *International Journal of Cancer*, 134(12), pp. 2798–2807. doi: 10.1002/ijc.28623.

Kumar, S. and Mehta, K. (2012) 'Tissue transglutaminase constitutively activates HIF-1 α promoter and nuclear factor- κ B via a non-canonical pathway', *PloS One*, 7(11), p. e49321. doi: 10.1371/journal.pone.0049321.

Kumar, V. *et al.* (2015) 'Systematic annotation of celiac disease loci refines pathological pathways and suggests a genetic explanation for increased interferon-gamma levels', *Human Molecular Genetics*, 24(2), pp. 397–409. doi: 10.1093/hmg/ddu453.

Kuriakose, T. and Kanneganti, T. D. (2018) 'Gasdermin D Flashes an Exit Signal for IL-1', *Immunity*, 48(1), pp. 1–3. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.003.

Kurt-Jones, E. A., Kiely, J. M. and Unanue, E. R. (1985) 'Conditions required for expression of membrane IL 1 on B cells.', *The Journal of Immunology*, 135(3).

Lamas, B. *et al.* (2020) 'Aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is decreased in celiac disease leading to intestinal inflammation', *Science Translational Medicine*, 12(566). doi: 10.1126/scitranslmed.aba0624.

Langer, V. *et al.* (2019) 'IFN- γ drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption', *Journal of Clinical Investigation*, 129(11), pp. 4691–4707. doi: 10.1172/JCI124884.

Langlais, D., Barreiro, L. B. and Gros, P. (2016) 'The macrophage IRF8/IRF1 regulome is required for protection against infections and is associated with chronic inflammation', *The Journal of Experimental Medicine*, 213(4), pp. 585–603. doi: 10.1084/jem.20151764.

Law, L. A. *et al.* (2018) 'GAS6/TAM Pathway Signaling in Hemostasis and Thrombosis', *Frontiers in Medicine*, 5. doi: 10.3389/fmed.2018.00137.

Lawless, V. A. *et al.* (2000) 'Stat4 Regulates Multiple Components of IFN- γ -Inducing Signaling Pathways', *The Journal of Immunology*, 165(12), pp. 6803–6808. doi: 10.4049/jimmunol.165.12.6803.

Lazear, H. M. M., Nice, T. J. J. and Diamond, M. S. S. (2015) 'Interferon- λ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond', *Immunity*, 43(1), pp. 15–28. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.001.

Lazear, H. M., Schoggins, J. W. and Diamond, M. S. (2019) 'Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons', *Immunity*, 50(4), p. 907. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2019.03.025.

LeBlanc, P. M. *et al.* (2014) 'An immunogenic peptide in the A-box of HMGB1 protein reverses apoptosis-induced tolerance through RAGE receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), pp. 7777–7786. doi: 10.1074/jbc.M113.541474.

Lebwohl, B. and Rubio-Tapia, A. (2021) 'Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease', *Gastroenterology*, 160(1), pp. 63–75. doi: 10.1053/J.GASTRO.2020.06.098.

Lee, C. H. *et al.* (2014) 'High glucose induces human endothelial dysfunction through an Axl-dependent mechanism', *Cardiovascular Diabetology*, 13(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/1475-2840-13-53.

Lee, J. W. *et al.* (2008) 'Differential Regulation of Chemokines by IL-17 in Colonic Epithelial Cells', *The Journal of Immunology*, 181(9), pp. 6536–6545. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.6536.

Leeuwen, M. A. Van *et al.* (2013) 'Increased production of interleukin-21, but not interleukin-17A, in the small intestine characterizes pediatric celiac disease', *Mucosal Immunology*, 6(6), pp. 1202–1213. doi: 10.1038/mi.2013.19.

Lefrançois, E. *et al.* (2012) 'IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), pp. 1673–1678. doi: 10.1073/pnas.1115884109.

Lefrançois, E. *et al.* (2014) 'Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation

- of group-2 innate lymphoid cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(43), pp. 15502–15507. doi: 10.1073/pnas.1410700111.
- Leibach, F. H. and Ganapathy, V. (1996) 'Peptide transporters in the intestine and the kidney', *Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews Inc., pp. 99–119. doi: 10.1146/annurev.nu.16.070196.000531.
- Leonard, M. M. and Vasagar, B. (2014) 'US perspective on gluten-related diseases', *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, pp. 25–37. doi: 10.2147/CEG.S54567.
- Leonard, W. J. and Wan, C.-K. K. (2016) 'IL-21 Signaling in Immunity', *F1000Research*, 5(0), pp. 1–10. doi: 10.12688/f1000research.7634.1.
- Li, X. *et al.* (2017) 'Luteolin inhibits angiogenesis by blocking Gas6/Axl signaling pathway', *International Journal of Oncology*, 51(2), pp. 677–685. doi: 10.3892/ijo.2017.4041.
- Liang, Y. *et al.* (2017) 'IL-33 promotes antiviral CD8+ T cells through the mTORC1 pathway and limits liver injury via recruiting immunosuppressive neutrophils', *The Journal of Immunology*, 198(1 Supplement), pp. 78.3-78.3. Available at: https://www.jimmunol.org/content/198/1_Supplement/78.3.
- Lin, D. *et al.* (2016) 'Membrane IL1 Inhibits the Development of Hepatocellular Carcinoma via Promoting T- and NK-cell Activation', *Cancer Research*, 76(11), pp. 3179–3188. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2658.
- Lindner, S. *et al.* (2013) 'Interleukin 21-induced granzyme b-expressing b cells infiltrate tumors and regulate t cells', *Cancer Research*, 73(8), pp. 2468–2479. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3450.
- Lionetti, E. *et al.* (2015) 'Celiac disease from a global perspective', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 29(3), pp. 365–379. doi: 10.1016/J.BPG.2015.05.004.
- Lionetti, E. and Catassi, C. (2011) 'New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment', *International reviews of immunology*, 30(4), pp. 219–231. doi: 10.3109/08830185.2011.602443.
- Liu, S. *et al.* (2006) 'HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(4), pp. 990–999. doi: 10.1152/ajpcell.00308.2005.
- Liu, S. *et al.* (2007) 'IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells', *International immunology*, 19(10), pp. 1213–1221. doi: 10.1093/INTIMM/DXM093.
- Liu, S. M. and King, C. (2013) 'IL-21–Producing Th Cells in Immunity and Autoimmunity', *The Journal of Immunology*, 191(7), pp. 3501–3506. doi: 10.4049/jimmunol.1301454.
- López-Casado, M. A. *et al.* (2017) 'Potential role of the IL-33/ST2 axis in celiac disease', *Cellular and Molecular Immunology*, 14(3), pp. 285–292. doi: 10.1038/cmi.2015.85.
- Loschinski, R. *et al.* (2018) 'IL-21 modulates memory and exhaustion phenotype of T-cells in a fatty acid oxidation-dependent manner', *Oncotarget*, 9(17), pp. 13125–13138. doi: 10.18632/oncotarget.24442.
- Lott, J. M. *et al.* (2015) 'New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity', *Journal of Leukocyte Biology*, 97(6), pp. 1037–1048. doi: 10.1189/JLB.3RI1214-595R.
- Louka, A. S. and Sollid, L. M. (2003) 'HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder', *Tissue Antigens*, 61(2), pp. 105–117. doi: 10.1034/j.1399-0039.2003.00017.x.
- Lu, B. *et al.* (2013) 'Regulation of HMGB1 release by inflammasomes', *Protein and Cell*, 4(3), pp. 163–167. doi: 10.1007/s13238-012-2118-2.
- Lu, B. *et al.* (2014) 'JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8), pp. 3068–3073. doi: 10.1073/pnas.1316925111.
- Lu, Q. and Lemke, G. (2001) 'Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family', *Science*, 293(5528), pp. 306–311. doi: 10.1126/SCIENCE.1061663/SUPPL_FILE/1061663S1_THUMB.GIF.
- Lu, Y. *et al.* (2017) 'Regulated intramembrane proteolysis of the AXL receptor kinase generates an intracellular domain that localizes in the nucleus of cancer cells', *FASEB Journal*, 31(4), pp. 1382–1397. doi: 10.1096/fj.201600702R.

- Lubkov, V. and Bar-Sagi, D. (2014) 'E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic cell extrusion', *Current Biology*, 24(8), pp. 868–874. doi: 10.1016/j.cub.2014.02.057.
- Luda, K. M. *et al.* (2016) 'IRF8 Transcription-Factor-Dependent Classical Dendritic Cells Are Essential for Intestinal T Cell Homeostasis', *Immunity*, 44(4), pp. 860–874. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2016.02.008/ATTACHMENT/DF758F71-C1A0-4D6A-87BC-8BD62E3413F8/MMC1.PDF.
- Ludvigsson, J. F. *et al.* (2013) 'The Oslo definitions for coeliac disease and related terms', *Gut*, 62(1), pp. 43–52. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301346.
- Lundin, K. E. A. *et al.* (1993) 'Gliadin-specific, HLA-DQ(α 1*0501, β 1*0201) restricted t cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients', *Journal of Experimental Medicine*, 178(1), pp. 187–196. doi: 10.1084/jem.178.1.187.
- Luo, Z. *et al.* (2019) 'Kinetics of immune cell responses in the multiple low-dose streptozotocin mouse model of type 1 diabetes', *FASEB BioAdvances*, 1(9), pp. 538–549. doi: 10.1096/fba.2019-00031.
- Lüthi, A. U. *et al.* (2009) 'Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases', *Immunity*, 31(1), pp. 84–98. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.007.
- Ma, L. *et al.* (2015) 'High mobility group box 1: a novel mediator of Th2-type response-induced airway inflammation of acute allergic asthma', *Journal of Thoracic Disease*, 7(10), p. 1732. doi: 10.3978/J.ISSN.2072-1439.2015.10.18.
- MacLennan, I. C. M. *et al.* (2003) 'Extrafollicular antibody responses', *Immunological reviews*, 194, pp. 8–18. doi: 10.1034/J.1600-065X.2003.00058.X.
- Maglio, M. *et al.* (2011) 'Immunogenicity of two oat varieties, in relation to their safety for celiac patients', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46(10), pp. 1194–1205. doi: 10.3109/00365521.2011.603159.
- Magni, S. *et al.* (2014) 'MIRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in celiac disease', *American Journal of Gastroenterology*, 109(10), p. 1662. doi: 10.1038/ajg.2014.203.
- Maher, S. G. *et al.* (2008) 'IFN α and IFN λ differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity', *Cancer Biology and Therapy*, 7(7), pp. 1109–1115. doi: 10.4161/cbt.7.7.6192.
- Malhotra, S. *et al.* (2011) 'Search for specific biomarkers of IFN β bioactivity in patients with multiple sclerosis', *PLoS ONE*. Edited by J. Priller, 6(8), p. e23634. doi: 10.1371/journal.pone.0023634.
- Maluf, S. W. *et al.* (2020) 'DNA damage, oxidative stress, and inflammation in children with celiac disease', *Genetics and Molecular Biology*, 43(2), pp. 1–8. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0390.
- Manti, S., Cuppari, C., Tardino, L., *et al.* (2017) 'HMGB1 as a new biomarker of celiac disease in children: A multicenter study', *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 37, pp. 18–21. doi: 10.1016/j.nut.2016.12.011.
- Manti, S., Cuppari, C., Parisi, G. F., *et al.* (2017) 'HMGB1 values and response to HBV vaccine in children with celiac disease', *Nutrition*, 42, pp. 20–22. doi: 10.1016/j.nut.2017.05.012.
- Mantovani, A. *et al.* (2019) 'Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity', *Immunity*, 50(4), pp. 778–795. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.012.
- Marasco, G. *et al.* (2016) 'Gut Microbiota and Celiac Disease', *Digestive Diseases and Sciences*, 61(6), pp. 1–12. doi: 10.1007/s10620-015-4020-2.
- Maria, N. I. *et al.* (2014) 'MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjögren's syndrome', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(6), pp. 1052–1059. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202552.
- Marsh, M. N. (1992) 'Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue')', *Gastroenterology*, 102(1), pp. 330–354. doi: 10.1016/0016-5085(92)91819-P.
- Marsh, M. N., Villanacci, V. and Srivastava, A. (2015) 'Histology of gluten related disorders', *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 8(2), pp. 171–177. doi: 10.22037/ghfbb.v8i2.743.
- Martelli-Junior, H. *et al.* (2003) 'Effect of Transforming Growth Factor- β 1, Interleukin-6, and Interferon- γ on the Expression of Type I Collagen, Heat Shock Protein 47, Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and

- MMP-2 by Fibroblasts from Normal Gingiva and Hereditary Gingival Fibromatosis', *Journal of Periodontology*, 74(3), pp. 296–306. doi: 10.1902/jop.2003.74.3.296.
- Martín-Fontecha, A. *et al.* (2003) 'Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node', *The Journal of Experimental Medicine*, 198(4), pp. 615–621. doi: 10.1084/jem.20030448.
- Martin-Sanchez, D. *et al.* (2017) 'Ferroptosis, but not necroptosis, is important in nephrotoxic folic acid-induced AKI', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(1), pp. 218–229. doi: 10.1681/ASN.2015121376.
- Martin, M. U. (2013) 'Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex', *Seminars in Immunology*, 25(6), pp. 449–457. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.006.
- Martin, N. T. and Martin, M. U. (2016) 'Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin', *Nature Immunology*, 17(2), pp. 122–131. doi: 10.1038/ni.3370.
- Matta, B. M. *et al.* (2014) 'IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(8), pp. 4010–4020. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1400481.
- Mattei, F. *et al.* (2001) 'IL-15 Is Expressed by Dendritic Cells in Response to Type I IFN, Double-Stranded RNA, or Lipopolysaccharide and Promotes Dendritic Cell Activation', *The Journal of Immunology*, 167(3), pp. 1179–1187. doi: 10.4049/jimmunol.167.3.1179.
- Matysiak-Budnik, T. *et al.* (2008) 'Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease', *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), pp. 143–154. doi: 10.1084/JEM.20071204.
- Matzinger, P. (2002) 'The danger model: A renewed sense of self', *Science*, 296(5566), pp. 301–305. doi: 10.1126/science.1071059.
- Mazzarella, G. (2015) 'Effector and suppressor T cells in celiac disease.', *World Journal of Gastroenterology*, 21(24), pp. 7349–7356. doi: 10.3748/wjg.v21.i24.7349.
- McGough, J. M. *et al.* (2008) 'DNA methylation represses IFN- γ -induced and signal transducer and activator of transcription 1-mediated IFN regulatory factor 8 activation in colon carcinoma cells', *Molecular Cancer Research*, 6(12), pp. 1841–1851. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0280.
- McNab, F. *et al.* (2015) 'Type I interferons in infectious disease', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 87–103. doi: 10.1038/nri3787.
- Mehta, D. S. *et al.* (2005) 'NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), pp. 2016–2021. doi: 10.1073/pnas.0409512102.
- Melaragno, M. G., Fridell, Y. W. C. and Berk, B. C. (1999) 'The Gas6/Axl system: a novel regulator of vascular cell function.', *Trends in cardiovascular medicine*, 9(8), pp. 250–3. doi: 10.1016/S1050-1738(00)00027-X.
- Meresse, B. *et al.* (2004) 'Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease', *Immunity*, 21(3), pp. 357–366. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.020.
- Meresse, B. *et al.* (2006) 'Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease', *Journal of Experimental Medicine*, 203(5), pp. 1343–1355. doi: 10.1084/jem.20060028.
- Mesin, L., Sollid, L. M. and Di Niro, R. (2012) 'The intestinal B-cell response in celiac disease', *Frontiers in Immunology*, 3(OCT), pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2012.00313.
- Messmer, D. *et al.* (2004) 'High Mobility Group Box Protein 1: An Endogenous Signal for Dendritic Cell Maturation and Th1 Polarization', *The Journal of Immunology*, 173(1), pp. 307–313. doi: 10.4049/jimmunol.173.1.307.
- Meunier, E. *et al.* (2014) 'Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases', *Nature*, 509(7500), pp. 366–370. doi: 10.1038/nature13157.
- Migdall-Wilson, J. *et al.* (2012) 'Prolonged exposure to a Mer ligand in leukemia: Gas6 favors expression of a partial Mer glycoform and reveals a novel role for Mer in the nucleus', *PLoS ONE*. Edited by I. Agoulnik, 7(2), p. e31635. doi: 10.1371/journal.pone.0031635.

- Millar, N. L. *et al.* (2017) 'Wounds that heal and wounds that don't – The role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, pp. 41–50. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.007.
- Millar, N. L., Murrell, G. A. C. C. and McInnes, I. B. (2013) 'Alarmins in tendinopathy: unravelling new mechanisms in a common disease', *Rheumatology*, 52(5), pp. 769–779. doi: 10.1093/rheumatology/kes409.
- Molberg, Ø *et al.* (1997) 'Gliadin Specific, HLA DQ2-Restricted T Cells are Commonly Found in Small Intestinal Biopsies from Coeliac Disease Patients, but not from Controls', *Scandinavian Journal of Immunology*, 46(3), pp. 103–109. doi: 10.1046/J.1365-3083.1996.D01-17.X.
- Molofsky, A. B. *et al.* (2015) 'Interleukin-33 And Interferon gamma Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation During Immune Perturbation', *Immunity*, 43(1), pp. 161–174. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.019.
- Molofsky, A. B. B., Savage, A. K. K. and Locksley, R. M. M. (2015) 'Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation', *Immunity*, 42(6), pp. 1005–1019. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.006.
- Monsuur, A. J. *et al.* (2005) 'Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect', *Nature Genetics* 37:12, 37(12), pp. 1341–1344. doi: 10.1038/ng1680.
- Monteleone, G. *et al.* (2001) 'Role of interferon α in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease', *Gut*, 48(3), pp. 425–429. doi: 10.1136/gut.48.3.425.
- Monteleone, I. *et al.* (2010) 'Characterization of IL-17A-Producing Cells in Celiac Disease Mucosa', *The Journal of Immunology*, 184(4), pp. 2211–2218. doi: 10.4049/jimmunol.0901919.
- Monticelli, L. A. *et al.* (2015) 'IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), pp. 10762–10767. doi: 10.1073/pnas.1509070112.
- Moretti, S. *et al.* (2018) 'Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease article', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 9(6). doi: 10.1038/s41424-018-0031-6.
- Morita, E. *et al.* (2012) 'Prevalence of Wheat Allergy in Japanese Adults', *Allergology International*, 61(1), pp. 101–105. doi: 10.2332/ALLERGOLINT.11-OA-0345.
- Morrow, M. P. *et al.* (2009) 'Comparative ability of IL-12 and IL-28B to regulate Treg populations and enhance adaptive cellular immunity', *Blood*, 113(23), pp. 5868–5877. doi: 10.1182/blood-2008-11-190520.
- Moussion, C., Ortega, N. and Girard, J. P. (2008) 'The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel "Alarmin"?'', *PLoS ONE*, 3(10), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0003331.
- Mühl, H. (2013) 'Pro-inflammatory signaling by IL-10 and IL-22: Bad habit stirred up by interferons?', *Frontiers in Immunology*, 4(FRB). doi: 10.3389/fimmu.2013.00018.
- Mulder, S. J. and Mulder-Bos, G. C. (2006) 'Most probable origin of coeliac disease is low immune globulin A in the intestine caused by malfunction of Peyer's patches', *Medical Hypotheses*, 66(4), pp. 757–762. doi: 10.1016/j.mehy.2005.09.050.
- Murray, R. Z. and Stow, J. L. (2014) 'Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking', *Frontiers in Immunology*, 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00538.
- Nadal, I. *et al.* (2007) 'Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease', *Journal of Medical Microbiology*, 56(12), pp. 1669–1674. doi: 10.1099/JMM.0.47410-0/CITE/REFWORKS.
- Nagata, S. (2018) 'Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells', *Annual Review of Immunology*, 36, pp. 489–517. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.
- Najafov, A. *et al.* (2019) 'TAM Kinases Promote Necroptosis by Regulating Oligomerization of MLKL', *Molecular Cell*, 75(3), pp. 457–468.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2019.05.022.
- Nanayakkara, M. *et al.* (2018) 'P31–43, an undigested gliadin peptide, mimics and enhances the innate immune response to viruses and interferes with endocytic trafficking: a role in celiac disease', *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-28830-y.

- Nassar, M., Tabib, Y., Capucha, T., Mizraji, G., Nir, T., Pevsner-Fischer, M., *et al.* (2017) 'GAS6 is a key homeostatic immunological regulator of host-commensal interactions in the oral mucosa', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(3), pp. E337–E346. doi: 10.1073/pnas.1614926114.
- Nassar, M., Tabib, Y., Capucha, T., Mizraji, G., Nir, T. and Pevsner-fischer, M. (2017) 'GAS6 is a key homeostatic immunological regulator of host – commensal interactions in the oral mucosa'. doi: 10.1073/pnas.1614926114.
- Nassar, M. *et al.* (2018) 'Multiple regulatory levels of growth arrest-specific 6 in mucosal immunity against an oral pathogen', *Frontiers in Immunology*, 9(JUN). doi: 10.3389/fimmu.2018.01374.
- Nefla, M. *et al.* (2016) 'The danger from within: alarmins in arthritis', *Nature Reviews Rheumatology*, 12(11), pp. 669–683. doi: 10.1038/nrrheum.2016.162.
- Negróni, A. *et al.* (2017) 'RIP3 AND pMLKL promote necroptosis-induced inflammation and alter membrane permeability in intestinal epithelial cells', *Digestive and Liver Disease*, 49(11), pp. 1201–1210. doi: 10.1016/j.dld.2017.08.017.
- Nepal, S. *et al.* (2019) 'STAT6 induces expression of Gas6 in macrophages to clear apoptotic neutrophils and resolve inflammation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(33), pp. 16513–16518. doi: 10.1073/pnas.1821601116.
- Nilsen, E. M. *et al.* (1995) 'Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma.', *Gut*, 37(6), pp. 766–776. doi: 10.1136/gut.37.6.766.
- Nilsen, E. M. *et al.* (1998) 'Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease', *Gastroenterology*, 115(3), pp. 551–563. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70134-9.
- Di Niro, R., Mesin, L., Zheng, N.-Y., *et al.* (2012) 'Abundance and unique repertoire of plasma cells secreting IgA autoantibodies to transglutaminase 2 in the intestinal lesion of celiac disease', *Nat Med.*, 18(3), pp. 441–445. doi: 10.1038/nm.2656.
- Di Niro, R., Mesin, L., Zheng, N. Y., *et al.* (2012) 'High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions', *Nature Medicine*, 18(3), pp. 441–445. doi: 10.1038/nm.2656.
- Noordenbos, T. *et al.* (2016) 'Human mast cells capture, store, and release bioactive, exogenous IL-17A', *Journal of Leukocyte Biology*, 100(3), pp. 453–462. doi: 10.1189/jlb.3hi1215-542r.
- Noppert, S. J., Fitzgerald, K. A. and Hertzog, P. J. (2007) 'The role of type I interferons in TLR responses', *Immunology and Cell Biology*, pp. 446–457. doi: 10.1038/sj.icb.7100099.
- Novatt, H. *et al.* (2016) 'Distinct Patterns of Expression of Transcription Factors in Response to Interferon β and Interferon λ 1', *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 36(10), pp. 589–598. doi: 10.1089/jir.2016.0031.
- O'Brien, T. R., Prokunina-Olsson, L. and Donnelly, R. P. (2014) 'IFN- λ 4: The paradoxical new member of the interferon lambda family', *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 34(11), pp. 829–838. doi: 10.1089/jir.2013.0136.
- Ochayon, D. E. *et al.* (2019) 'Interleukin-33 promotes type 1 cytokine expression via p38 MAPK in human natural killer cells'.
- Odendall, C. *et al.* (2014) 'Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes', *Nature Immunology*, 15(8), pp. 717–726. doi: 10.1038/ni.2915.
- Okada, Y. *et al.* (2014) 'Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery', *Nature*, 506(7488), pp. 376–381. doi: 10.1038/nature12873.
- Olazagoitia-Garmendia, A., Sebastian-delaCruz, M. and Castellanos-Rubio, A. (2021) 'Involvement of lncRNAs in celiac disease pathogenesis', *International Review of Cell and Molecular Biology*, 358, pp. 241–264. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.10.004.
- Olivares, M. *et al.* (2015) 'The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease', *Gut*, 64(3), pp. 406–417. doi: 10.1136/GUTJNL-2014-306931.

- Ong, M. L. D. M. *et al.* (2020) 'Differential regulation of claudin-2 and claudin-15 expression in children and adults with malabsorptive disease', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 100(3), pp. 483–490. doi: 10.1038/S41374-019-0324-8.
- Orning, P. *et al.* (2018) 'Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8–dependent cleavage of gasdermin D and cell death', *Science*, 362(6418), pp. 1064–1069. doi: 10.1126/science.aau2818.
- Ozaki, H. *et al.* (1999) 'Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(2), pp. 553–557. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395639>.
- Ozaki, K. *et al.* (2004) 'Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6', *The Journal of Immunology*, 173(9), pp. 5361–5371. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5361.
- Palazon, A. *et al.* (2017) 'An HIF-1 α /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression', *Cancer Cell*, 32(5), pp. 669–683.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2017.10.003.
- De Palma, G. *et al.* (2012) 'Modulation of phenotypic and functional maturation of dendritic cells by intestinal bacteria and gliadin: relevance for celiac disease', *Journal of Leukocyte Biology*, 92(5), pp. 1043–1054. doi: 10.1189/jlb.1111581.
- Palone, F. *et al.* (2018) 'Faecal high mobility group box 1 in children with celiac disease: A pilot study', *Digestive and Liver Disease*, 50(9), pp. 916–919. doi: 10.1016/j.dld.2018.04.003.
- Palová-Jelínková, L. *et al.* (2005) 'Gliadin Fragments Induce Phenotypic and Functional Maturation of Human Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 175(10), pp. 7038–7045. doi: 10.4049/JIMMUNOL.175.10.7038.
- Panda, D. *et al.* (2019) 'IRF1 maintains optimal constitutive expression of antiviral genes and regulates the early antiviral response', *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), pp. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2019.01019.
- Pang, I. K., Ichinohe, T. and Iwasaki, A. (2013) 'IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8⁺ T cell responses to influenza A virus', *Nature Immunology* 2013 14:3, 14(3), pp. 246–253. doi: 10.1038/ni.2514.
- Paoletta, G. *et al.* (2018) 'The toxic alpha-gliadin peptide 31–43 enters cells without a surface membrane receptor', *Cell Biology International*, 42(1), pp. 112–120. doi: 10.1002/CBIN.10874.
- Paolini, R. *et al.* (2015) 'NK cells and interferons', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26(2), pp. 113–120. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.11.003.
- Paolino, M. *et al.* (2014) 'The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells', *Nature*, 507(7493), pp. 508–512. doi: 10.1038/nature12998.
- Di Paolo, N. C. *et al.* (2014) 'IL-1 α and Complement Cooperate in Triggering Local Neutrophilic Inflammation in Response to Adenovirus and Eliminating Virus-Containing Cells', *PLOS Pathogens*, 10(3), p. e1004035. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1004035.
- Di Paolo, N. C. and Shayakhmetov, D. M. (2016) 'Interleukin 1 α and the inflammatory process', *Nature Immunology*, 17(8), pp. 906–913. doi: 10.1038/ni.3503.
- Park, I. K. *et al.* (2009) 'The Axl/Gas6 pathway is required for optimal cytokine signaling during human natural killer cell development', *Blood*, 113(11), pp. 2470–2477. doi: 10.1182/BLOOD-2008-05-157073.
- Parks, O. B. *et al.* (2016) 'Interleukin-22 signaling in the regulation of intestinal health and disease', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(JAN). doi: 10.3389/fcell.2015.00085.
- Parzanese, I. *et al.* (2017) 'Celiac disease: From pathophysiology to treatment', *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(2), p. 27. doi: 10.4291/wjgp.v8.i2.27.
- Pavlovic, M., Berenji, K. and Bukurov, M. (2017) 'Screening of celiac disease in Down syndrome - Old and new dilemmas', *World Journal of Clinical Cases*, 5(7), p. 264. doi: 10.12998/wjcc.v5.i7.264.
- Peeters, M. J. W. *et al.* (2019) 'MERTK Acts as a costimulatory receptor on human cd8 t cells', *Cancer Immunology Research*, 7(9), pp. 1472–1484. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0841.
- Peeters, M. J. W., Rahbech, A. and thor Straten, P. (2020) 'TAM-ing T cells in the tumor

- microenvironment: implications for TAM receptor targeting', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(2), pp. 237–244. doi: 10.1007/s00262-019-02421-w.
- Peng, M. *et al.* (2016) 'Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism', *Science*, 354(6311), pp. 481–484. doi: 10.1126/science.aaf6284.
- Perez, F. *et al.* (2021) 'Programmed Cell Death in the Small Intestine: Implications for the Pathogenesis of Celiac Disease', *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 7426*, 22(14), p. 7426. doi: 10.3390/IJMS22147426.
- Pestka, S., Krause, C. D. and Walter, M. R. (2004) 'Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors', *Immunological Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 8–32. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x.
- Picascia, S. *et al.* (2017) 'Gliadin-Specific CD8+ T Cell Responses Restricted by HLA Class I A*0101 and B*0801 Molecules in Celiac Disease Patients', *The Journal of Immunology*, 198(5), pp. 1838–1845. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1601208.
- Pichery, M. *et al.* (2012) 'Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel Il-33–LacZ Gene Trap Reporter Strain', *The Journal of Immunology*, 188(7), pp. 3488–3495. doi: 10.4049/jimmunol.1101977.
- Pietras, E. M. *et al.* (2016) 'Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal', *Nature Cell Biology 2016 18:6*, 18(6), pp. 607–618. doi: 10.1038/ncb3346.
- Pietz, G. *et al.* (2017) 'Immunopathology of childhood celiac disease - Key role of intestinal epithelial cells', *PLoS ONE*, 12(9), p. e0185025. doi: 10.1371/journal.pone.0185025.
- Pisarello, M. L. J. *et al.* (2014) 'Decrease in lactobacilli in the intestinal microbiota of celiac children with a gluten-free diet, and selection of potentially probiotic strains', <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0472>, 61(1), pp. 32–37. doi: 10.1139/CJM-2014-0472.
- Pisetsky, D. S., Erlandsson-Harris, H. and Andersson, U. (2008) 'High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease', *Arthritis Research & Therapy*, 10(3), p. 209. doi: 10.1186/ar2440.
- Platanias, L. C. (2005) 'Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling', *Nature Reviews Immunology*, 5(5), pp. 375–386. doi: 10.1038/nri1604.
- Plugis, N. M. *et al.* (2017) 'Thioredoxin-1 selectively activates transglutaminase 2 in the extracellular matrix of the small intestine: Implications for celiac disease', *Journal of Biological Chemistry*, 292(5), pp. 2000–2008. doi: 10.1074/jbc.M116.767988.
- Poholek, C. H. *et al.* (2019) 'IL-21 Controls ILC3 Cytokine Production and Promotes a Protective Phenotype in a Mouse Model of Colitis', *ImmunoHorizons*, 3(6), pp. 194–202. doi: 10.4049/immunohorizons.1900005.
- Pot, C. *et al.* (2009) 'Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(2), pp. 797–801. doi: 10.4049/jimmunol.0901233.
- Pott, J. *et al.* (2011) 'IFN- λ determines the intestinal epithelial antiviral host defense', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), pp. 7944–7949. doi: 10.1073/pnas.1100552108.
- Pott, J. and Stockinger, S. (2017) 'Type I and III Interferon in the Gut: Tight Balance between Host Protection and Immunopathology', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00258.
- Pozo Rubio, T. *et al.* (2013) 'Influence of early environmental factors on peripheral lymphocyte subsets and gut microbiota in infants at risk for celiac disease', *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(OCE1), pp. 7190–7199. doi: 10.1017/S0029665113000232.
- Du Pré, M. F. and Sollid, L. M. (2015) 'T-cell and B-cell immunity in celiac disease', *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 29(3), pp. 413–423. doi: 10.1016/j.bpg.2015.04.001.

- Priyanka, P., Gayam, S. and Kupec, J. T. (2018) 'The role of a low fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, and polyol diet in nonceliac gluten sensitivity', *Gastroenterology Research and Practice*, 2018. doi: 10.1155/2018/1561476.
- Qiao, S.-W. *et al.* (2004) 'Antigen Presentation to Celiac Lesion-Derived T Cells of a 33-Mer Gliadin Peptide Naturally Formed by Gastrointestinal Digestion', *The Journal of Immunology*, 173(3), pp. 1757–1762. doi: 10.4049/jimmunol.173.3.1757.
- Ramírez-sánchez, A. D. *et al.* (2020) 'Molecular biomarkers for celiac disease: Past, present and future', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), pp. 1–23. doi: 10.3390/ijms21228528.
- Ranzato, E., Martinotti, S. and Patrone, M. (2015) 'Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer', *ImmunoTargets and Therapy*, p. 101. doi: 10.2147/itt.s58064.
- Rashid, M. and Lee, J. (2016) 'Serologic testing in celiac disease Practical guide for clinicians', *Canadian Family Physician*, 62(1), pp. 38–43.
- Read, S. A. *et al.* (2019) 'Macrophage Coordination of the Interferon Lambda Immune Response', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 2674. doi: 10.3389/fimmu.2019.02674.
- Rebsamen, M. *et al.* (2009) 'DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF- κ B', *EMBO Reports*, 10(8), pp. 916–922. doi: 10.1038/embor.2009.109.
- Reichenbach, D. K. *et al.* (2015) 'The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD', *Blood*, 125(20), pp. 3183–3192. doi: 10.1182/BLOOD-2014-10-606830.
- Reinke, Y. *et al.* (2011) 'Impairment of protein trafficking by direct interaction of gliadin peptides with actin', *Experimental Cell Research*, 317(15), pp. 2124–2135. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.05.022.
- Rewers, M. (2005) 'Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease?', *Gastroenterology*, 128(4 Suppl 1). doi: 10.1053/J.GASTRO.2005.02.030.
- Rezaei-Tavirani, S., Rostami-Nejad, M. and Montazar, F. (2019) 'Highlighted role of VEGFA in follow up of celiac disease', *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 12(3), pp. 254–259. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31528310> (Accessed: 19 January 2021).
- Rider, P. *et al.* (2017) 'Alarmins: Feel the Stress', *The Journal of Immunology*, 198(4), pp. 1395–1402. doi: 10.4049/jimmunol.1601342.
- Riegler, A. N. *et al.* (2019) 'Necroptotic cell death promotes adaptive immunity against colonizing pneumococci', *Frontiers in Immunology*, 10(APR), p. 615. doi: 10.3389/fimmu.2019.00615.
- Rios, D. *et al.* (2015) 'Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria', *Mucosal Immunology* 2016 9:4, 9(4), pp. 907–916. doi: 10.1038/mi.2015.121.
- Rius, J. *et al.* (2008) 'NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α ', *Nature*, 453(7196), pp. 807–811. doi: 10.1038/nature06905.
- Rivers-Auty, J. *et al.* (2018) 'Redefining the ancestral origins of the interleukin-1 superfamily', *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-018-03362-1.
- Roberts, A. I. *et al.* (2001) 'Cutting Edge: NKG2D Receptors Induced by IL-15 Costimulate CD28-Negative Effector CTL in the Tissue Microenvironment', *The Journal of Immunology*, 167(10), pp. 5527–5530. doi: 10.4049/JIMMUNOL.167.10.5527.
- Rogge, L. *et al.* (1998) 'The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs', *Journal of Immunology*, 161(12), pp. 6567–6574.
- Rosa, J. S. *et al.* (2008) 'Sustained IL-1 α , IL-4, and IL-6 elevations following correction of hyperglycemia in children with type 1 diabetes mellitus', *Pediatric Diabetes*, 9(1), pp. 9–16. doi: 10.1111/J.1399-5448.2007.00243.X.
- Rothlin, C. V. *et al.* (2007) 'TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response', *Cell*, 131(6), pp. 1124–1136. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.034.
- Rothlin, C. V. *et al.* (2015) 'TAM receptor signaling in immune homeostasis', *Annual Review of Immunology*, 33(1), pp. 355–391. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112103.
- Round, J. L. and Mazmanian, S. K. (2009) 'The gut microbiota shapes intestinal immune responses during

- health and disease', *Nature Reviews Immunology* 2009 9:5, 9(5), pp. 313–323. doi: 10.1038/nri2515.
- Rovere-Querini, P. *et al.* (2004) 'HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells', *EMBO Reports*, 5(8), pp. 825–830. doi: 10.1038/sj.embor.7400205.
- Ruera, C. N. *et al.* (2021) 'Sterile inflammation drives multiple programmed cell death pathways in the gut', *Journal of Leukocyte Biology*, 109(1), pp. 211–221. doi: 10.1002/JLB.3MA0820-660R.
- Ruggeri, C. *et al.* (2008) 'Celiac disease and non-organ-specific autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection', *Digestive diseases and sciences*, 53(8), pp. 2151–2155. doi: 10.1007/S10620-007-0146-1.
- Sabat, R., Ouyang, W. and Wolk, K. (2014) 'Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, pp. 21–38. doi: 10.1038/nrd4176.
- Di Sabatino, A. *et al.* (2007) 'Evidence for the Role of Interferon-alfa Production by Dendritic Cells in the Th1 Response in Celiac Disease', *Gastroenterology*, 133(4), pp. 1175–1187. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.018.
- Salveti, V. M. *et al.* (2005) 'Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured celiac intestinal mucosa', *Gut*, 54(1), pp. 46–53. doi: 10.1136/GUT.2003.023150.
- Sánchez, E., Laparra, J. M. and Sanz, Y. (2012) 'Discerning the role of *Bacteroides fragilis* in celiac disease pathogenesis', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), pp. 6507–6515. doi: 10.1128/AEM.00563-12.
- Sangfelt, O. and Strander, H. (2001) 'Apoptosis and cell growth inhibition as antitumor effector functions of interferons', *Medical Oncology*, 18(1), pp. 3–14. doi: 10.1385/MO:18:1:3.
- Santarasci, V. *et al.* (2013) 'IL-1 and T helper immune responses', *Frontiers in Immunology*, 4(JUL), p. 182. doi: 10.3389/FIMMU.2013.00182/BIBTEX.
- Sarhan, J. *et al.* (2019) 'Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis', *Cell Death & Differentiation*, 26(2), pp. 332–347. doi: 10.1038/s41418-018-0122-7.
- Sarhan, M. *et al.* (2018) 'Origin and consequences of necroinflammation', *Physiological Reviews*, 98(2), pp. 727–780. doi: 10.1152/physrev.00041.2016.
- Sarra, M. *et al.* (2013) 'IL-15 positively regulates IL-21 production in celiac disease mucosa', *Mucosal Immunology*, 6(2), pp. 244–255. doi: 10.1038/mi.2012.65.
- Scaffidi, P., Misteli, T. and Bianchi, M. E. (2002) 'Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation', *Nature* 2002 418:6894, 418(6894), pp. 191–195. doi: 10.1038/nature00858.
- Scaleia, R. La *et al.* (2012) 'Size and dynamics of mucosal and peripheral IL-17A+ T-cell pools in pediatric age, and their disturbance in celiac disease', *Mucosal Immunology*, 5(5), pp. 513–523. doi: 10.1038/mi.2012.26.
- Schafer, S. L. *et al.* (1998) 'Regulation of Type I Interferon Gene Expression by Interferon Regulatory Factor-3 *', *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), pp. 2714–2720. doi: 10.1074/JBC.273.5.2714.
- Schaper, F. *et al.* (2016) 'High mobility group box 1 skews macrophage polarization and negatively influences phagocytosis of apoptotic cells', *Rheumatology (United Kingdom)*, 55(12), pp. 2260–2270. doi: 10.1093/rheumatology/kew324.
- Schaupp, L. *et al.* (2020) 'Microbiota-Induced Type I Interferons Instruct a Poised Basal State of Dendritic Cells', *Cell*, 181(5), pp. 1080–1096.e19. doi: 10.1016/J.CELL.2020.04.022.
- Schenten, D. *et al.* (2014) 'Signaling through the Adaptor Molecule MyD88 in CD4+ T Cells Is Required to Overcome Suppression by Regulatory T Cells', *Immunity*, 40(1), pp. 78–90. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.10.023.
- Schiavoni, G., Mattei, F. and Gabriele, L. (2013) 'Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response', *Frontiers in Immunology*, 4(DEC). doi: 10.3389/FIMMU.2013.00483.
- Schiering, C. *et al.* (2014) 'The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine', *Nature*,

513(7519), pp. 564–568. doi: 10.1038/nature13577.

Schmid, E. T. *et al.* (2016) ‘AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity’, *eLife*. Edited by Z. J. Chen, 5, p. e12414. doi: 10.7554/elife.12414.

Schmitz, J. *et al.* (2005) ‘IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines’, *Immunity*, 23(5), pp. 479–490. doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.015.

Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. and Rice, C. M. (2014) ‘Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses’, *Annual Review of Immunology*, 32(1), pp. 513–545. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231.

Schreiber, G. (2017) ‘The molecular basis for differential type I interferon signaling’, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., pp. 7285–7294. doi: 10.1074/jbc.R116.774562.

Schroder, K. *et al.* (2004) ‘Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions’, *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), pp. 163–189. doi: 10.1189/jlb.0603252.

Schuler, P. *et al.* (2012) ‘HMGB1 conveys immunosuppressive characteristics on regulatory and conventional T cells’, *International Immunology*, 24(8), pp. 485–494. doi: 10.1093/intimm/dxs051.

Schumann, M. *et al.* (2012) ‘Defective tight junctions in refractory celiac disease’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1), pp. 43–51. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06565.x.

Schumann, M. *et al.* (2017) ‘Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier’, *Cmgh*, 3(2), pp. 150–162. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.006.

Scutera, S. *et al.* (2009) ‘Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN- α -inducible Axl/Gas6 pathway.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(5), pp. 3004–3013. doi: 10.4049/jimmunol.0804384.

Seitz, H. M. *et al.* (2007) ‘Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells’, *The Journal of Immunology*, 178(9), pp. 5635–5642. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5635.

Sellebjerg, F. *et al.* (2009) ‘Identification of new sensitive biomarkers for the in vivo response to interferon- β treatment in multiple sclerosis using DNA-array evaluation’, *European Journal of Neurology*, 16(12), pp. 1291–1298. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02716.x.

Sen, P. *et al.* (2007) ‘Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF- κ B activation in dendritic cells’, *Blood*, 109(2), pp. 653–660. doi: 10.1182/blood-2006-04-017368.

Serena, G. *et al.* (2017) ‘Proinflammatory cytokine interferon- γ and microbiome-derived metabolites dictate epigenetic switch between forkhead box protein 3 isoforms in celiac disease’, *Clinical & Experimental Immunology*, 187(3), pp. 490–506. doi: 10.1111/cei.12911.

Shalimar *et al.* (2013) ‘Mechanism of villous atrophy in celiac disease: Role of apoptosis and epithelial regeneration’, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(9), pp. 1262–1269. doi: 10.5858/arpa.2012-0354-OA.

Shan, L. *et al.* (2002) ‘Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue’, 297(September), pp. 2275–2280.

Shan, L. *et al.* (2005) ‘Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue’, *Journal of proteome research*, 4(5), pp. 1732–1741. doi: 10.1021/PR050173T.

Shao, W.-H., Eisenberg, R. A. and Cohen, P. L. (2008) ‘The Mer Receptor Tyrosine Kinase Is Required for the Loss of B Cell Tolerance in the Chronic Graft-versus-Host Disease Model of Systemic Lupus Erythematosus’, *The Journal of Immunology*, 180(11), pp. 7728–7735. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7728.

Shao, W. H. *et al.* (2014) ‘The Mertk receptor tyrosine kinase promotes T-B interaction stimulated by IgD B-cell receptor cross-linking’, *Journal of Autoimmunity*, 53(C), pp. 78–84. doi: 10.1016/j.jaut.2014.03.004.

Sharif, M. N. *et al.* (2006) ‘Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl’, *undefined*, 203(8), pp. 1891–1901. doi: 10.1084/JEM.20051725.

- Shewry, P. R. and Halford, N. G. (2002) 'Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization', *Journal of Experimental Botany*, 53(370), pp. 947–958. doi: 10.1093/JEXBOT/53.370.947.
- Shlomovitz, I. *et al.* (2019) 'Necroptosis directly induces the release of full-length biologically active IL-33 in vitro and in an inflammatory disease model', *The FEBS Journal*, 286(3), pp. 507–522. doi: 10.1111/febs.14738.
- Silano, M., Agostoni, C. and Guandalini, S. (2010) 'Effect of the timing of gluten introduction on the development of celiac disease', *World journal of gastroenterology*, 16(16), pp. 1939–1942. doi: 10.3748/WJG.V16.I16.1939.
- Sims, G. P. *et al.* (2010) 'HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews , pp. 367–388. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132603.
- Singh, S. *et al.* (2018) 'Interleukin-17 regulates matrix metalloproteinase activity in human pulmonary tuberculosis', *The Journal of Pathology*, 244(3), pp. 311–322. doi: 10.1002/path.5013.
- Sinha, S. *et al.* (2015) 'Targeted Axl inhibition primes chronic lymphocytic leukemia B cells to apoptosis and shows synergistic/additive effects in combination with BTK inhibitors', *Clinical Cancer Research*, 21(9), pp. 2115–2126. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1892.
- Smithgall, M. D. *et al.* (2008) 'IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th 2 cells, iNKT and NK Cells', *International Immunology*, 20(8), pp. 1019–1030. doi: 10.1093/intimm/dxn060.
- Smyrk, T. C. (2017) 'Practical Approach to the Flattened Duodenal Biopsy', *Surgical Pathology Clinics*, 10(4), pp. 823–839. doi: 10.1016/j.path.2017.07.004.
- Smyth, D. *et al.* (2012) 'Reduced surface expression of epithelial E-cadherin evoked by interferon-gamma is Fyn kinase-dependent', *PLoS One*, 7(6), p. e38441. doi: 10.1371/journal.pone.0038441.
- Sollid, L. M. *et al.* (1989) 'Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer', *Journal of Experimental Medicine*, 169(1), pp. 345–350. doi: 10.1084/jem.169.1.345.
- Sollid, L. M. (2002) 'Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder', *Nature Reviews Immunology*, 2(9), pp. 647–655. doi: 10.1038/nri885.
- Sollid, L. M. *et al.* (2019) 'Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease-relevant gluten epitopes recognized by CD4+ T cells', *Immunogenetics* 2019 72:1, 72(1), pp. 85–88. doi: 10.1007/S00251-019-01141-W.
- Sollid, L. M. and Lundin, K. E. A. (2019) 'Celiac disease', *The Autoimmune Diseases*, pp. 849–869. doi: 10.1016/B978-0-12-812102-3.00045-2.
- Song, H.-A. A. *et al.* (2017) 'Hypoxia modulates epithelial permeability via regulation of vascular endothelial growth factor in airway epithelia', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(5), pp. 527–535. doi: 10.1165/rcmb.2016-0080OC.
- Souza-Fonseca-Guimaraes, F. *et al.* (2015) 'NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), pp. E2376–E2384. doi: 10.1073/PNAS.1424241112/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Spadaro, F. *et al.* (2012) 'IFN- α enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing', *Blood*, 119(6), pp. 1407–1417. doi: 10.1182/BLOOD-2011-06-363564.
- Srinivas, S. *et al.* (2008) 'Interferon- λ 1 (interleukin-29) preferentially down-regulates interleukin-13 over other T helper type 2 cytokine responses in vitro', *Immunology*, 125(4), pp. 492–502. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02862.x.
- Stanifer, M. L., Pervolaraki, K. and Boulant, S. (2019) 'Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), p. 1445. doi: 10.3390/ijms20061445.
- Stav-Noraas, T. E. *et al.* (2017) 'Endothelial IL-33 Expression Is Augmented by Adenoviral Activation of the DNA Damage Machinery', *The Journal of Immunology*, 198(8), pp. 3318–3325. doi: 10.4049/jimmunol.1600054.

- Steinsbø, Ø. *et al.* (2014) 'Restricted VH/VL usage and limited mutations in gluten-specific IgA of coeliac disease lesion plasma cells', *Nature Communications*, 5(May). doi: 10.1038/ncomms5041.
- Stene, L. C. *et al.* (2006) 'Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: A longitudinal study', *American Journal of Gastroenterology*, 101(10), pp. 2333–2340. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00741.x.
- Stepankova, R. *et al.* (1996) 'Changes in jejunal mucosa after long-term feeding of germfree rats with gluten', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31(6), pp. 551–557. doi: 10.3109/00365529609009127.
- Stephanou, A. *et al.* (2000) 'Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters', *Cell Death & Differentiation* 2000 7:3, 7(3), pp. 329–330. doi: 10.1038/sj.cdd.4400656.
- Stojiljković, V. *et al.* (2012) 'Glutathione redox cycle in small intestinal mucosa and peripheral blood of pediatric celiac disease patients', *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 84(1), pp. 175–184. doi: 10.1590/S0001-37652012000100018.
- Strengell, M. *et al.* (2002) 'IL-21 Up-Regulates the Expression of Genes Associated with Innate Immunity and Th1 Response', *The Journal of Immunology*, 169(7), pp. 3600–3605. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3600.
- Strengell, M. *et al.* (2003) 'IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN- γ Production in Human NK and T Cells', *The Journal of Immunology*, 170(11), pp. 5464–5469. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5464.
- Strengell, M., Julkunen, I. and Matikainen, S. (2004) 'IFN- α regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 76(2), pp. 416–422. doi: 10.1189/jlb.1003488.
- Strittmatter, G. E. *et al.* (2016) 'IFN- γ Primes Keratinocytes for HSV-1-Induced Inflammasome Activation', *Journal of Investigative Dermatology*, 136(3), pp. 610–620. doi: 10.1016/j.jid.2015.12.022.
- Subramanian, M. *et al.* (2014) 'An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo', *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), pp. 1296–1308. doi: 10.1172/JCI72051.
- Sundberg, E. *et al.* (2009) 'High mobility group box chromosomal protein 1 acts as a proliferation signal for activated T lymphocytes', *Immunobiology*, pp. 303–309. doi: 10.1016/j.imbio.2008.09.006.
- Symons, J. A., Young, P. R. and Duff, G. W. (1995) 'Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), p. 1714. doi: 10.1073/PNAS.92.5.1714.
- Szabo, S. J. *et al.* (2000) 'A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment', *Cell*, 100(6), pp. 655–669. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80702-3.
- Taylor, P. *et al.* (2007) 'The Feedback Phase of Type I Interferon Induction in Dendritic Cells Requires Interferon Regulatory Factor 8', *Immunity*, 27(2), pp. 228–239. doi: 10.1016/j.immuni.2007.06.009.
- Takaoka, A. *et al.* (2000) 'Cross talk between interferon- γ and - α/β signaling components in caveolar membrane domains', *Science*, 288(5475), pp. 2357–2360. doi: 10.1126/science.288.5475.2357.
- Takaoka, A. *et al.* (2007) 'DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response', *Nature*, 448(7152), pp. 501–505. doi: 10.1038/nature06013.
- Tamiya, T. *et al.* (2011) 'Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: Regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), pp. 980–985. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207464.
- Tang, D. *et al.* (2019) 'The molecular machinery of regulated cell death', *Cell Research*, 29(5), pp. 347–364. doi: 10.1038/s41422-019-0164-5.
- Taniguchi, T. *et al.* (2001) 'IRF family of transcription factors as regulators of host defense', *Annual Review of Immunology*. Annu Rev Immunol, pp. 623–655. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.623.
- Tau, G. and Rothman, P. (1999) 'Biologic functions of the IFN- γ receptors', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 54(12), pp. 1233–1251. doi: 10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x.

Taylor, P. R. *et al.* (2014) 'Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ t and dectin-2', *Nature Immunology*, 15(2), pp. 143–151. doi: 10.1038/ni.2797.

Tibrewal, N. *et al.* (2008) 'Autophosphorylation docking site Tyr-867 in Mer receptor tyrosine kinase allows for dissociation of multiple signaling pathways for phagocytosis of apoptotic cells and down-modulation of lipopolysaccharide-inducible NF- κ B transcriptional activation', *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), pp. 3618–3627. doi: 10.1074/jbc.M706906200.

Tortola, L. *et al.* (2019) 'IL-21 promotes allergic airway inflammation by driving apoptosis of FoxP3+ regulatory T cells', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(6), pp. 2178–2189.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2018.11.047.

Triantafyllou, E. *et al.* (2018) 'MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of inflammation in acute liver failure', *Gut*, 67(2), pp. 333–347. doi: 10.1136/GUTJNL-2016-313615.

Tripathi, A. *et al.* (2009) 'Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(39), pp. 16799–16804. doi: 10.1073/PNAS.0906773106.

Tsai, S.-J. *et al.* (2018) 'Abstract 2488: Functional characterization of nuclear TYRO3 in colorectal cancer', *Cancer Research*, 78(13 Supplement), p. 2488. doi: 10.1158/1538-7445.AM2018-2488.

Tsuchiya, K. *et al.* (2021) 'Gasdermin D mediates the maturation and release of IL-1 α downstream of inflammasomes', *Cell Reports*, 34(12), p. 108887. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108887.

Tu, J.-F. *et al.* (2016) 'Mast Cells Comprise the Major of Interleukin 17-Producing Cells and Predict a Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma', *Medicine*, 95(13). doi: 10.1097/MD.0000000000003220.

Udagawa, K. *et al.* (2021) 'Overexpression of Interleukin-1 α Suppresses Liver Metastasis of Lymphoma : Implications for Antitumor Effects of CD8 + T-cells', pp. 1–11. doi: 10.1369/0022155421991634.

Unterholzner, L. *et al.* (2010) 'IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA', *Nature Immunology*, 11(11), pp. 997–1004. doi: 10.1038/ni.1932.

Vannay, M. *et al.* (2010) 'Increased expression of hypoxia-inducible factor 1 α in coeliac disease', *Pediatric Research*, 68(2), pp. 118–122. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181e5bc96.

Vazquez-Tello, A. *et al.* (2012) 'IL-17A and IL-17F expression in B lymphocytes', *International Archives of Allergy and Immunology*, 157(4), pp. 406–416. doi: 10.1159/000329527.

Venter, C. *et al.* (2006) 'Prevalence of sensitization reported and objectively assessed food hypersensitivity amongst six-year-old children: A population-based study', *Pediatric Allergy and Immunology*, 17(5), pp. 356–363. doi: 10.1111/j.1399-3038.2006.00428.x.

Verri, W. A. *et al.* (2010) 'IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(9), pp. 1697–1703. doi: 10.1136/ard.2009.122655.

Villalta, D. *et al.* (2010) 'IgG antibodies against deamidated gliadin peptides for diagnosis of celiac disease in patients with IgA deficiency', *Clinical chemistry*, 56(3), pp. 464–468. doi: 10.1373/CLINCHEM.2009.128132.

Villanacci, V. *et al.* (2011) 'Coeliac disease : The histology report', pp. 385–395. doi: 10.1016/S1590-8658(11)60594-X.

Vorobjova, T. *et al.* (2009) 'Increased FOXP3 expression in small-bowel mucosa of children with coeliac disease and type I diabetes mellitus', <https://doi.org/10.1080/00365520802624177>, 44(4), pp. 422–430. doi: 10.1080/00365520802624177.

Vorobjova, T. (2015) 'Increased density of tolerogenic dendritic cells in the small bowel mucosa of celiac patients', *World Journal of Gastroenterology*, 21(2), p. 439. doi: 10.3748/wjg.v21.i2.439.

Wallet, M. A. *et al.* (2008) 'MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance', *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), pp. 219–232. doi: 10.1084/jem.20062293.

Wang, F. *et al.* (2018) 'Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity', *EBioMedicine*, 30, pp. 303–316. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.02.009.

- Wang, H. *et al.* (2006) 'Potential Role of High Mobility Group Box 1 in Viral Infectious Diseases', *https://home.liebertpub.com/vim*, 19(1), pp. 3–9. doi: 10.1089/VIM.2006.19.3.
- Wang, J. *et al.* (2020) 'HMGB1 participates in LPS-induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophages and inducing polarization of M1 macrophages via TLR2, TLR4, and RAGE/NF- κ B signaling pathways', *International Journal of Molecular Medicine*, 45(1), pp. 61–80. doi: 10.3892/ijmm.2019.4402.
- Wang, W. *et al.* (2019) 'CD8+ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy', *Nature*, 569(7755), pp. 270–274. doi: 10.1038/s41586-019-1170-y.
- Wapenaar, M. C. *et al.* (2004) 'The interferon gamma gene in celiac disease: Augmented expression correlates with tissue damage but no evidence for genetic susceptibility', *Journal of Autoimmunity*, 23(2), pp. 183–190. doi: 10.1016/j.jaut.2004.05.004.
- Wapenaar, M. C. *et al.* (2008) 'Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis An unusual case of ascites', *Gut*, 57(4), pp. 463–467. doi: 10.1136/GUT.2007.133132.
- Watchmaker, P. B. *et al.* (2014) 'Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice', *Nature Immunology*, 15(1), pp. 98–108. doi: 10.1038/ni.2768.
- Watts, E. R. and Walmsley, S. R. (2019) 'Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, pp. 33–46. doi: 10.1016/j.molmed.2018.10.006.
- Wei, L. *et al.* (2007) 'IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner', *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), pp. 34605–34610. doi: 10.1074/jbc.M705100200.
- Wessendorf, J. H. M. *et al.* (1993) 'Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 α precursor', *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), pp. 22100–22104. doi: 10.1016/s0021-9258(20)80653-x.
- Wieser, H. (2007) 'Chemistry of gluten proteins', *Food Microbiology*, 24(2), pp. 115–119. doi: 10.1016/j.fm.2006.07.004.
- Wiggins, K. A. *et al.* (2019) 'IL-1 α cleavage by inflammatory caspases of the noncanonical inflammasome controls the senescence-associated secretory phenotype', *Aging Cell*, 18(3), p. e12946. doi: 10.1111/accel.12946.
- Willemsen, L. E. M. *et al.* (2005) 'Abrogation of IFN- γ mediated epithelial barrier disruption by serine protease inhibition', *Clinical and Experimental Immunology*, 142(2), pp. 275–284. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02906.x.
- Witte, E. *et al.* (2010) 'Interleukin-22: A cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(5), pp. 365–379. doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2010.08.002.
- Wood, K. J. and Sawitzki, B. (2006) 'Interferon γ : a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo', *Trends in Immunology*, 27(4), pp. 183–187. doi: 10.1016/j.it.2006.02.008.
- Wu, J. *et al.* (2011) 'Increased plasma levels of the soluble Mer tyrosine kinase receptor in systemic lupus erythematosus relate to disease activity and nephritis', *Arthritis Research & Therapy*, 13(2), p. R62. doi: 10.1186/ar3316.
- Wu, Y. *et al.* (2005) 'A role for Mer tyrosine kinase in α v β 5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells', *Journal of Cell Science*, 118(3), pp. 539–553. doi: 10.1242/jcs.01632.
- Xia, J. *et al.* (2006) 'Inhibition of HLA-DQ2-Mediated Antigen Presentation by Analogues of a High Affinity 33-Residue Peptide from α 2-Gliadin', *Journal of the American Chemical Society*, 128(6), pp. 1859–1867. doi: 10.1021/JA056423O.
- Xiao, Y. *et al.* (2019) 'Interleukin-33 Promotes REG3 γ Expression in Intestinal Epithelial Cells and Regulates Gut Microbiota', *Cmgh*, 8(1), pp. 21–36. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.02.006.
- Xu, J. *et al.* (2014) 'Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis', *Cell Death and Differentiation*, 21(8), pp. 1229–1239. doi: 10.1038/cdd.2014.40.
- Yang, D. *et al.* (2020) 'ZBP1 mediates interferon-induced necroptosis', *Cellular and Molecular*

- Immunology*, 17(4), pp. 356–368. doi: 10.1038/s41423-019-0237-x.
- Yang, H. *et al.* (2010) ‘A critical cysteine is required for HMGB1 binding to toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), pp. 11942–11947. doi: 10.1073/pnas.1003893107.
- Yang, Q. *et al.* (2011) ‘IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8 + T cells’, *European Journal of Immunology*, 41(11), pp. 3351–3360. doi: 10.1002/eji.201141629.
- Yang, S. *et al.* (2014) ‘Interferon- γ -induced intestinal epithelial barrier dysfunction by NF- κ B/HIF-1 α pathway’, *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 34(3), pp. 195–203. doi: 10.1089/jir.2013.0044.
- Yeo, J. G. *et al.* (2016) ‘Proteolytic inactivation of nuclear alarmin high-mobility group box 1 by complement protease C1s during apoptosis’, *Cell Death Discovery*, 2(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/cddiscovery.2016.69.
- Yeste, A. *et al.* (2014) ‘IL-21 induces IL-22 production in CD4+ T cells’, *Nature Communications*, 5(1), p. 3753. doi: 10.1038/ncomms4753.
- Yi, Q. *et al.* (1997) ‘Myeloma bone marrow plasma cells: evidence for their capacity as antigen-presenting cells’, *Blood*, 90(5), pp. 1960–1967. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292530>.
- Yin, H. *et al.* (2013) ‘IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages’, *Molecular Immunology*, 56(4), pp. 347–353. doi: 10.1016/j.molimm.2013.05.225.
- YOKOZEKI, H. *et al.* (1997) ‘Interferon-gamma differentially regulates CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2/B70) expression on human Langerhans cells’, *British Journal of Dermatology*, 136(6), pp. 831–837. doi: 10.1046/J.1365-2133.1997.01843.X.
- Yoshida, K. *et al.* (1995) ‘Studies on natural ST2 gene products in the human leukemic cell line UT-7 using monoclonal antihuman ST2 antibodies’, *Hybridoma*, 14(5), pp. 419–427. doi: 10.1089/hyb.1995.14.419.
- Youakim, A. and Ahdieh, M. (1999) ‘Interferon- γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin’, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276(5 39-5), pp. G1279-1288. doi: 10.1152/ajpgi.1999.276.5.g1279.
- Yuan, F. *et al.* (2004) ‘Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), pp. 20935–20940. doi: 10.1074/jbc.M401931200.
- Zagórska, A. *et al.* (2014) ‘Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function’, *Nature Immunology*, 15(10), pp. 920–928. doi: 10.1038/ni.2986.
- Zamakhchari, M. *et al.* (2011) ‘Identification of Rothia Bacteria as Gluten-Degrading Natural Colonizers of the Upper Gastro-Intestinal Tract’, *PLOS ONE*, 6(9), p. e24455. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0024455.
- Zamora, R. *et al.* (2019) ‘HMGB1 is a Central Driver of Dynamic Pro-inflammatory Networks in Pediatric Acute Liver Failure induced by Acetaminophen’, *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-42564-5.
- Zanoni, I., Granucci, F. and Broggi, A. (2017) ‘Interferon (IFN)- λ Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs’, *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), p. 1661. doi: 10.3389/fimmu.2017.01661.
- Zanzi, D. *et al.* (2011) ‘IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease’, *The American Journal of Gastroenterology*, 106(7), pp. 1308–1317. doi: 10.1038/ajg.2011.80.
- Zeng, B. *et al.* (2019) ‘ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases’, *Cell Death & Disease*, 10(4), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41419-019-1540-2.
- Zhang, A. *et al.* (2014) ‘Necrostatin-1 inhibits Hmgb1-IL-23/IL-17 pathway and attenuates cardiac ischemia reperfusion injury’, *Transplant International*, 27(10), pp. 1077–1085. doi: 10.1111/TRI.12349.
- Zhang, L. *et al.* (2011) ‘TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium’, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(9), pp. 1383–1391. doi: 10.1016/j.biocel.2011.06.003.
- Zhang, Xinyan *et al.* (2019) ‘Interleukin-22 regulates the homeostasis of the intestinal epithelium during inflammation’, *International Journal of Molecular Medicine*, 43(4), pp. 1657–1668. doi:

10.3892/ijmm.2019.4092.

Zhao, G. *et al.* (2017) 'Growth Arrest-Specific 6 Enhances the Suppressive Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Mainly through Axl Receptor', *Mediators of Inflammation*. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/6848430/>.

Zhen, D. Y. *et al.* (2017) 'Alarmins and immunity', *Immunological Reviews*, 280(1), pp. 41–56. doi: 10.1111/imr.12577.

Zheng, Y. *et al.* (2013) 'Intracellular Interleukin-1 Receptor 2 Binding Prevents Cleavage and Activity of Interleukin-1 α , Controlling Necrosis-Induced Sterile Inflammation', *Immunity*, 38(2), pp. 285–295. doi: 10.1016/j.immuni.2013.01.008.

Zhou, Y. *et al.* (2008) 'IFN- γ induces apoptosis in HL-60 cells through decreased Bcl-2 and increased Bak expression', *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 28(2), pp. 65–72. doi: 10.1089/jir.2007.0025.

Zhu, D. *et al.* (2010) 'Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor', *Blood*, 115(23), pp. 4963–4972. doi: 10.1182/blood-2010-01-262386.

Zhu, Y. *et al.* (2019) 'STING: A master regulator in the cancer-immunity cycle', *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd., pp. 1–15. doi: 10.1186/s12943-019-1087-y.

Zimmer, K.-P. *et al.* (2010) 'Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes.', *Gut*, 59(3), pp. 300–310. doi: 10.1136/gut.2008.169656.

Zuo, P. Y. *et al.* (2014) 'Growth arrest-specific gene 6 protein promotes the proliferation and migration of endothelial progenitor cells through the PI3K/AKT signaling pathway', *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), pp. 299–306. doi: 10.3892/ijmm.2014.1754.