



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Estudio de los mecanismos de muerte celular en la mucosa de  
intestino delgado***

---

**Tesista: Lic. Ruera, Carolina Naymé**

**Director: Dr. Chirido, Fernando Gabriel**

**Año: 2022**



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

---

I I F P

Instituto de Estudios  
Inmunológicos y Fisiopatológicos

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

**La Plata, Buenos Aires, Marzo de 2022**

*A mis amigos,  
Por alimentar mi ser.*

# Agradecimientos

*Gracias a mis papás, Doris y Juan, por confiar en mi deseo de ejercer esta profesión, por apoyarme cada día de mi vida y darme el impulso que se necesita cuando las cosas se ponen difíciles. Les agradezco por llenarme de amor y haberme hecho lo que soy hoy. Gracias a mis hermanos, Laureano y Federico, por ser las luces de mi vida, mis compañeros en el camino, mis modelos a seguir. Gracias a Tita por su compañía en mis días de análisis de resultados.*

*Gracias a Fernando por confiar en mí, por darme un espacio en su equipo de trabajo, tomarse el tiempo para escucharme, charlar conmigo y aconsejarme, por dejarme ser yo misma, por ser mi guía. Gracias a Pau, la pieza clave del equipo, por ser mi apoyo moral, por su entrega incondicional, por su amistad. Gracias a los chicos, Fede, Ema, Flor GC, Flor R, Gise, Gero, Luz, Ro porque juntos crecimos, aprendimos, nos mandamos mocos pero seguimos firmes entendiendo que lo más importante es nunca dejarnos solos. Gracias grupo Chirido por convertirse en parte de mi familia.*

*Gracias a quienes me permitieron ejercer en estos años mi vocación de enseñar, especialmente a mis pollitos formales Ro y Ro, aprendí junto con ustedes y agradezco su predisposición para seguir mis consejos. Gracias a los que alguna vez me permitieron transmitirles mis conocimientos con toda la pasión y el amor que me caracteriza y sobre todo gracias a todos los que se tomaron el tiempo de parar con la vorágine que el laboratorio representa para enseñarme alguna técnica o darme algún tip, en especial a Fede por las IFIs, Ema y Pau por el manejo de animales y Maxi por los western blots.*

*Gracias a mis amigos no científicos, Agus, Oso, Mariam, Ana, por el apoyo incondicional.*

*Gracias a mis amigos del IIFP que me ayudaron en los días difíciles, que siempre estuvieron ahí para darme un consejo, un abrazo, un mimo. Gracias por los recuerdos que me llevo, los viajes, las cervezas, la comida, los bailes, los brillos, las partidas de pool, bowling o truco. Gracias por las charlas de pasillo, los abrazos y mates entre incubaciones, las risas, los llantos las frases con doble sentido y la paciencia.*

*Gracias en especial a mis Sis, Mai, Male, Gas y Kari, son y serán una de las cosas más hermosas que me llevo y agradezco por fin haber encontrado en ustedes el sentido de pertenencia que siempre había buscado. Gracias a Ivi, Rodri y Ema por todo su apoyo, por escucharme y estar siempre ahí siempre para compartir un matecito. Gracias a Mica, Juani, Maicha, Juli, Ema B, Carro, Romi, Mati, Bel, Cami, Dai, Lean, Agus, Andre, Costy, Yani, Pao, Juan, Dave, Pablo y todos los que pasaron por este hogar que es el IIFP y dejaron su huella en mi corazón.*

*Gracias a la gente de servicios por su paciencia y predisposición especialmente a Juan, Meli, Loli, Ceci e Iva por las charlas entre sacada de fotos y pasada de tubos.*

*Gracias a las gastroenterólogas, Laura, Lorena y en especial al Luciana, por su entrega a la hora de proveernos muestras.*

*En definitiva, gracias a todos ustedes que lograron que ame este proceso, me hicieron una persona, más valiosa en todo sentido, personal, emocional y profesional. Gracias por estar siempre presentes, gracias por alimentar mi ser.*

***¡Muchas gracias!***

*Estoy hecha de retazos, pedacitos coloridos de cada vida que pasa por la mía y que voy cosiendo en el alma. No siempre son bonitos, ni siempre felices, pero me hacen ser quien soy. En cada encuentro, en cada contacto, voy quedando mayor. En cada retazo una vida, una lección, un cariño, una nostalgia, que me hace más persona, más humana, más completa. Y pienso que es así como la vida se hace: de pedazos de otra gente que se van convirtiendo en parte de la gente también. Y la mejor parte es que nunca estaremos listos, finalizados, siempre habrá un retazo para añadir al alma.*

*Por lo tanto, gracias a cada uno de ustedes, que forman parte de mi vida y que me permiten engrandecer mi historia con sus retazos dejados en mí. Que yo también pueda dejar pedacitos de mí por los caminos y que puedan ser parte de sus historias. Y que así, de retazo en retazo podamos convertirnos, un día, en un inmenso bordado de “nosotros”.*

*Cora Carolina*

## Publicaciones científicas

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis doctoral forman parte de los siguientes artículos publicados en revistas internacionales:

1. “p31-43 gliadin peptide forms oligomers and induces NLRP3 inflammasome/caspase 1-dependent mucosal damage in small intestine”.  
María Florencia Gómez Castro #, Emanuel Miculán #, María Georgina Herrera #, **Carolina N Ruera**, Federico Perez, Eduardo Daniel Prieto, Exequiel Barrera, Sergio Pantano, Paula Carasi, Fernando Gabriel Chirido.  
Frontiers in Immunology. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00031>
2. “Sterile inflammation drives multiple programmed cell death pathways in the gut”.  
**Carolina N Ruera**, Emanuel Miculán, Federico Pérez, Gerónimo Ducca, Paula Carasi, Fernando G. Chirido.  
Journal of Leukocyte Biology. 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/JLB.3MA0820-660R>
3. “IL-33 alarmin and its active proinflammatory fragments are released in small intestine in Celiac disease”  
Federico Perez, **Carolina N Ruera**, Emanuel Miculán, Paula Carasi, Karen Dubois-Camacho, Laura Garbi, Luciana Guzmán, Marcela A. Hermoso and Fernando G. Chirido.  
Frontiers in Immunology. 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.581445
4. Review “Programmed cell death in the small intestine: implications for the pathogenesis of celiac disease.”  
Federico Perez, **Carolina N Ruera**, Emanuel Miculán, Paula Carasi, Fernando Gabriel Chirido.  
International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22(14), 7426.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22147426>.
5. “IL-1 $\beta$  blockade prevents cell death and mucosal damage of the small intestine in a model of sterile inflammation.”  
**Ruera Carolina N\***, Miculán Emanuel\*, Ducca Gerónimo, Pérez Federico, Iribarren María Luz, Carasi Paula and Chirido Fernando Gabriel. (\*These authors equally contributed to this work)  
Manuscrito enviado a Immunology Letters, febrero 2022.

## Resumen

La enfermedad celíaca (EC) es una enfermedad inmunomediada, multifactorial, que se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles ante la ingesta de un grupo de proteínas de trigo, cebada y centeno, que en forma colectiva y por simplicidad llamaremos gluten.

En la EC se produce daño en la mucosa del intestino delgado caracterizado por pérdida de la estructura de las vellosidades, hiperplasia de criptas y un marcado infiltrado linfocitario, tanto a nivel de la *lamina propria* como en el compartimento intraepitelial. Estos cambios conducen a la pérdida de la funcionalidad del intestino delgado y a un síndrome de malabsorción asociado a diversos signos clínicos que varían entre pacientes.

El daño histológico es causado por células citotóxicas, que generan muerte celular por apoptosis, principalmente inducida por citotoxicidad mediada por los linfocitos intraepiteliales. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de péptidos de gluten restringidos a los alelos de susceptibilidad HLA-DQ2/DQ8, presentes en la *lamina propria* que producen IFN $\gamma$ , potencian la actividad citotóxica y amplifican los mecanismos inflamatorios y de daño.

Aunque es claro que la apoptosis es un mecanismo relevante en la eliminación masiva de estas células, tanto en situaciones homeostáticas como en el contexto de la enteropatía, no se han realizado estudios detallados de la contribución de otras vías de muerte celular programada en EC.

La activación, regulación y entrecruzamiento entre estas vías se vuelve de extremo interés tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta a una infección o inflamación local, donde la muerte de los enterocitos puede potenciarse como consecuencia directa de un patógeno o producto de la respuesta inflamatoria, causando la pérdida de la integridad de la barrera y consecuentemente la exposición a MAMPs que potencian el reclutamiento y la activación de células inmunes inflamatorias.

Con el aporte de nuestro modelo murino de enteropatía, que nos permitió estudiar las vías de muerte proinflamatorias en el intestino delgado en condiciones no infecciosas, en este trabajo de tesis doctoral confirmamos que la vía de la apoptosis, descrita como la vía fundamental de eliminación masiva de células en el epitelio, se encuentra activa. De manera llamativa, observamos que existe un alto número de células muertas en la *lamina propria*, hallazgo que condujo a estudiar vías de muerte celular proinflamatoria.

De esta forma, demostramos el rol de la piroptosis en el modelo mediante el estudio de moléculas centrales de esta vía (caspasa-1, IL-1 $\beta$  y GSDMD) y probamos que el bloqueo *in vivo* de la piroptosis, mediante inhibición farmacológica o inmunoquímica (inhibidor de caspasa-1, NLRP3 o anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ , respectivamente) impide la inducción de daño mediante el estímulo inflamatorio. A su vez, confirmamos la implicancia de la necroptosis en este modelo.

Evaluando secciones de piezas de biopsias duodenales demostramos que la apoptosis es un tipo de muerte celular activa en la mucosa de los pacientes con enfermedad celíaca y que existe un elevado número de células TUNEL<sup>+</sup> en la *lamina propria*. Los hallazgos en el modelo murino nos impulsaron a estudiar la implicancia de los distintos mecanismos de muerte celular en la mucosa y a su vez a profundizar en otras vías de muerte celular no abordadas hasta el momento, como la necroptosis y piroptosis.

Estos estudios permiten mejorar nuestra comprensión sobre la inmunobiología de la mucosa del intestino delgado, tanto en situaciones normales como en el contexto de la enteropatía. El conocimiento generado tiene un alto impacto ya que podría ser utilizado en la prevención y la implementación de estrategias terapéuticas combinadas, que aumenten la eficiencia de los tratamientos convencionales y reduzcan la progresión o severidad de las complicaciones a largo plazo de la enfermedad celíaca y la inducción de enfermedades asociadas.



# Abreviaturas

|       |   |
|-------|---|
| ADN   | Ácido desoxirribonucleico   |
| ARNm  | Ácido ribonucleico mensajero                                      |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados al daño                            |
| DMSO  | Dimetil sulfóxido   |
| EC    | Enfermedad celíaca  |
| EI    | Enfermedad inflamatoria intestinal                                |
| GSDMD | Gasdermina D  |
| IEC   | Células del epitelio intestinal                                   |
| IELs  | Linfocitos intraepiteliales                                       |
| IP    | Ioduro de propidio  |
| JAMs  | Moléculas de adhesión   |
| MAMPs | Patrones moleculares asociados a microorganismos                  |
| NC    | Población no celíaca  |
| PBS   | Solución de buffer fosfato  |
| PCD   | Muerte celular programada   |
| qPCR  | Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa                     |
| ROS   | Especies reactivas de oxígeno                                     |
| TG2   | Transglutaminasa 2  |
| TUNEL | Terminal desoxynucleotidil transferase Tdt mediated dUTP nick end |
| UE    | Uniones estrechas   |
| V/C   | Relación vellosidad/cripta  |

# Índice

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| Agradecimientos .....           | IV  |
| Publicaciones científicas ..... | VI  |
| Resumen .....                   | VII |
| Abreviaturas.....               | IX  |
| Índice .....                    | X   |
| Índice de ilustraciones .....   | XIV |
| Índice de figuras.....          | XIV |
| Índice de tablas.....           | XVI |

## INTRODUCCIÓN GENERAL

|   |    |
|---|----|
| 1. Tracto gastrointestinal y sistema inmune .....   | 17 |
| 2. Enfermedad celíaca. Características clínicas, diagnóstico y bases moleculares de su patogenicia..... | 19 |
| 2.1 Genética de la enfermedad celíaca.....  | 21 |
| 2.2 Diagnóstico .....   | 22 |
| 2.2.1 Sintomatología en la enfermedad celíaca.....  | 22 |
| 2.2.2 Serología .....   | 23 |
| 2.2.3 Evaluación histológica.....   | 23 |
| 2.2.4 Tipificación de alelos de susceptibilidad HLA.....  | 24 |
| 2.3 Patogenicia en la enfermedad celíaca .....  | 24 |
| 2.4 Desestabilización de las uniones estrechas en enfermedad celíaca .....                              | 28 |
| 2.4.1 Complejos de unión intercelulares .....   | 28 |
| 2.4.2 Contribución al Ingreso de los fragmentos de gluten .....   | 30 |
| 3. Mecanismos de muerte celular programada.....   | 31 |
| 3.1 Muerte celular en mucosa intestinal en enfermedad celíaca .....                                     | 32 |
| 4. Modelos murinos para el estudio de enfermedad celíaca.....   | 34 |
| 4.1 Estudios de mecanismos de la inmunidad innata en enfermedad celíaca.....                            | 36 |
| Hipótesis .....   | 39 |
| Objetivos.....  | 39 |
| Objetivos específicos .....   | 39 |

## MATERIALES Y MÉTODOS

|   |    |
|---|----|
| 1. Obtención de Muestras Humanas .....  | 40 |
| 2. Obtención de Muestras Murinas .....  | 41 |
| 2.1 Ratones .....   | 41 |
| 2.2 Modelo experimental de enteropatía .....  | 41 |
| 2.3 Inhibición farmacológica .....  | 42 |
| 2.3.1 Inhibición de caspasa-1 .....   | 42 |
| 2.3.2 Inhibición de NLRP3 .....   | 42 |
| 2.3.3 Inhibidor de IL-1 $\beta$ .....   | 42 |
| 2.4 Aislamiento de epitelio intestinal y <i>lamina propria</i> a partir de muestras de intestino delgado de ratón ..... | 43 |
| 3. Análisis de western blot .....   | 43 |
| 4. Análisis de fluorescencia por microscopía confocal .....   | 44 |
| 5. Reacción de TUNEL .....  | 45 |
| 6. Análisis de expresión genética .....   | 46 |
| 6.1 Extracción ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc) .....  | 46 |
| 6.2 Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real .....  | 47 |
| 7. Análisis de citometría de flujo .....  | 47 |
| 8. Análisis estadístico .....   | 48 |

## CAPÍTULO 1: APOPTOSIS

|   |    |
|---|----|
| Introducción .....  | 49 |
| 1. Generalidades de la muerte celular por Apoptosis ..... | 49 |
| 1.1 Moléculas implicadas en la apoptosis .....            | 49 |
| 1.2 Mecanismos de la apoptosis .....                      | 51 |
| 1.2.1 Vía extrínseca de la apoptosis .....                | 52 |
| 1.2.2 Vía intrínseca de la apoptosis .....                | 53 |
| 2. Apoptosis en el intestino delgado .....                | 54 |
| 2.1 La apoptosis en enfermedad celiaca .....              | 56 |
| 2.2 Apoptosis en el modelo de enteropatía .....           | 58 |
| Justificación .....                                       | 60 |
| Objetivos específicos .....                               | 60 |
| Resultados .....  | 61 |

|  |    |
|--|----|
| 1. Muerte celular en el intestino delgado proximal .....   | 61 |
| 1.1 Análisis de la muerte celular en la mucosa duodenal .....  | 61 |
| 1.2 Caracterización de las poblaciones de células TUNEL <sup>+</sup> en <i>lamina propria</i> de pacientes celíacos .....      | 62 |
| 1.3 Citotoxicidad mediada por Granzima B.....  | 64 |
| 2. Evaluación de muerte celular por apoptosis en la mucosa duodenal.....   | 65 |
| 2.1 Análisis de la expresión de componentes claves de la vía apoptótica en la mucosa duodenal.....                             | 65 |
| 3. Evaluación de los mecanismos de muerte celular apoptótica en un modelo murino de enteropatía .....                          | 68 |
| 3.1 Análisis de la muerte celular apoptótica en el intestino delgado proximal de animales tratados con el péptido p31-43 ..... | 68 |
| 3.2 Apoptosis en epitelio y <i>lamina propria</i> de intestino delgado en el modelo experimental de enteropatía .....          | 70 |
| Discusión.....   | 78 |
| Conclusiones.....  | 83 |

## CAPÍTULO 2: PIROPTOSIS

|  |    |
|--|----|
| Introducción.....  | 84 |
| 1. Generalidades de la muerte celular por piroptosis.....  | 84 |
| 1.1 Receptores de la inmunidad innata .....  | 84 |
| 1.1.1 Receptores tipo Toll (TLRs) .....  | 85 |
| 1.1.2 Receptores tipo NOD (NLRs) .....   | 85 |
| 1.2 El inflammasoma NLRP3 .....  | 87 |
| 1.3 Bases moleculares de la muerte celular por Piroptosis .....  | 89 |
| 1.3.1 Vía canónica de la piroptosis.....   | 90 |
| 1.3.2 Vía no canónica de la piroptosis .....   | 91 |
| 2. Piroptosis en la mucosa intestinal y posible asociación con la enfermedad celíaca .....                           | 92 |
| Justificación.....   | 94 |
| Objetivos específicos .....  | 94 |
| Resultados .....   | 95 |
| 1. Análisis de la expresión de componentes claves de la piroptosis en la mucosa duodenal de pacientes celíacos ..... | 95 |
| 1.1 Inflammasomas y su implicancia en la activación de la vía canónica en enfermedad celíaca .....                   | 95 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.2 Estudio de la expresión de caspasa-1 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos .....   | 95  |
| 1.3 Estudio de la expresión de GSDMD en la mucosa duodenal de pacientes celíacos   | 97  |
| 1.4 Estudio de la expresión de IL-1 $\beta$ en mucosa duodenal de pacientes celíacos .....   | 99  |
| 1.5 Activación de caspasa-4 en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca .....  | 100 |
| 2. Evaluación de muerte celular por piroptosis en un modelo murino de enteropatía ..   | 101 |
| 2.1 Análisis de la inducción de piroptosis en el epitelio y <i>lamina propria</i> intestinal tras la administración intragástrica de p31-43 en un modelo murino de enteropatía ..... | 102 |
| 2.2 Empleo de inhibidores en ensayos <i>in vivo</i> para la evaluación de la actividad del inflammasoma en intestino delgado murino .....  | 106 |
| 2.2.1 La inhibición de caspasa-1 <i>in vivo</i> previene la muerte de células epiteliales inducida por p31-43.....   | 106 |
| 2.2.2 La inhibición de NLRP3 no previene la muerte de células epiteliales inducida por p31-43 <i>in vivo</i> .....   | 110 |
| 2.2.3 La inhibición de IL-1 $\beta$ previene la muerte de células epiteliales inducida por p31-43 <i>in vivo</i> .....   | 113 |
| Discusión.....   | 118 |
| Conclusiones.....  | 122 |

### CAPÍTULO 3: NECROPTOSIS

|   |     |
|---|-----|
| Introducción.....   | 124 |
| 1. Generalidades de la muerte celular programada por necroptosis .....  | 124 |
| 2. Necroptosis en el intestino delgado .....  | 126 |
| Justificación.....  | 128 |
| Objetivos específicos .....   | 128 |
| Resultados .....  | 129 |
| 1. Evaluación de muerte celular por necroptosis.....  | 129 |
| 1.1 Análisis de la expresión de componentes claves de la necroptosis en la mucosa duodenal de pacientes celíacos .....                        | 129 |
| 1.2 Caracterización de las poblaciones de células p-MLKL <sup>+</sup> en <i>lamina propria</i> y fondo de criptas de pacientes celíacos ..... | 131 |
| 2. Evaluación de muerte celular por necroptosis en un modelo murino de enteropatía ...  | 134 |
| Discusión.....  | 136 |
| Conclusiones.....   | 140 |
| Conclusión General.....   | 141 |
| Referencias bibliográficas .....  | 143 |

## Índice de ilustraciones

|   |            |
|---|------------|
| <i>Ilustración 1. Anatomía y componentes de la mucosa intestinal .....</i>  | <i>19</i>  |
| <i>Ilustración 2. Histología de la mucosa duodenal.....</i>   | <i>20</i>  |
| <i>Ilustración 3. Factores genéticos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 asociados con la EC .....</i>                                    | <i>22</i>  |
| <i>Ilustración 4. Histología en la enfermedad celíaca.....</i>  | <i>24</i>  |
| <i>Ilustración 5. Modelo resumido de la inmunopatogenia en enfermedad celíaca.....</i>                                    | <i>27</i>  |
| <i>Ilustración 6. Representación de las uniones intercelulares en el epitelio intestinal .....</i>                        | <i>30</i>  |
| <i>Ilustración 7. Modelo murino de enteropatía por la administración de p31-43.....</i>                                   | <i>38</i>  |
| <i>Ilustración 8. Diseño experimental de enteropatía por administración de p31-43 .....</i>                               | <i>41</i>  |
| <i>Ilustración 9. Diseño experimental de enteropatía por p31-43 e inhibidores.....</i>                                    | <i>42</i>  |
| <i>Ilustración 10. Estructura de las caspasas involucradas en la vía apoptótica .....</i>                                 | <i>50</i>  |
| <i>Ilustración 11. Mecanismos de activación de las caspasas .....</i>   | <i>51</i>  |
| <i>Ilustración 12. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis .....</i>  | <i>54</i>  |
| <i>Ilustración 13. Desprendimiento de células epiteliales intestinales.....</i>   | <i>56</i>  |
| <i>Ilustración 14. Esquema de las señales de muerte de enterocitos por receptores NK de IELs.</i>                         | <i>57</i>  |
| <i>Ilustración 15. Resumen de resultados de la vía apoptótica en la EC.....</i>   | <i>82</i>  |
| <i>Ilustración 16. Dominios estructurales de los receptores tipo NOD y ALR.....</i>                                       | <i>86</i>  |
| <i>Ilustración 17. Piroptosis en respuesta a la infección. Vía canónica y no canónica.....</i>                            | <i>89</i>  |
| <i>Ilustración 18. Ensamblaje de los inflamasomas.....</i>  | <i>90</i>  |
| <i>Ilustración 19. Resumen de resultados del empleo de inhibidores de componentes claves de la vía piroptótica .....</i>  | <i>121</i> |
| <i>Ilustración 20. Resumen de resultados de la vía piroptótica en la EC .....</i>   | <i>122</i> |
| <i>Ilustración 21. Vía de muerte celular por necroptosis .....</i>  | <i>126</i> |
| <i>Ilustración 22. Resumen de resultados de la vía necroptótica en la enfermedad celíaca ...</i>                          | <i>138</i> |
| <i>Ilustración 23. Resumen integral de las vías de muerte celular programada involucradas en la patogenia de EC .....</i> | <i>142</i> |

## Índice de figuras

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Figura 1. Aumento de la muerte celular en la mucosa duodenal de pacientes celíacos.....</i>  | <i>62</i> |
| <i>Figura 2. Caracterización de poblaciones de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propia de intestino delgado de pacientes celíacos .....</i>    | <i>64</i> |
| <i>Figura 3. Estudio de células Granzima B<sup>+</sup> en lamina propia de intestino delgado proximal de pacientes con EC.....</i>                | <i>65</i> |
| <i>Figura 4. Expresión aumentada de caspasa-8 y -3, en epitelio y lamina propia de duodeno de pacientes celíacos.....</i>                         | <i>66</i> |
| <i>Figura 5. Niveles aumentados de caspasa-8 y -3 clivadas en muestras duodenales de pacientes con EC activa.....</i>                             | <i>67</i> |
| <i>Figura 6. Aumento de la muerte celular en el intestino delgado proximal de animales tratados con p31-43.....</i>                               | <i>69</i> |
| <i>Figura 7. Caracterización de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propia de intestino delgado proximal de ratones tratados con p31-43 .....</i> | <i>70</i> |
| <i>Figura 8. Análisis de marcadores involucrados en rutas apoptóticas por PCR cuantitativa .....</i>  | <i>71</i> |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 9. Aumento de la expresión de caspasa-3 en células epiteliales y de la lamina propia de intestino delgado proximal ratones tratados con p31-43.....              | 72  |
| Figura 10. Activación de caspasa-3 en células epiteliales y de la lamina propia de intestino delgado de ratones tratados con gliadina p31-43.....                       | 74  |
| Figura 11. Activación de caspasa-8 en células epiteliales de ratones tratados con gliadina p31-43.....  | 75  |
| Figura 12. Aumento de la expresión de caspasa-8 activa en células epiteliales de ratones tratados con gliadina p31-43.....  | 75  |
| Figura 13. Aumento de la muerte celular en el epitelio intestinal por administración de p31-43  | 76  |
| Figura 14. Expresión de inflamasomas en mucosa duodenal.....  | 95  |
| Figura 15. Mayor expresión de caspasa-1 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos .....   | 96  |
| Figura 16. Mayor expresión de GSDMD en epitelio y lamina propia de intestino delgado de pacientes celíacos.....   | 97  |
| Figura 17. Mayor expresión de fragmento N-terminal de GSDMD en pacientes celíacos.....  | 98  |
| Figura 18. Mayor expresión de IL-1 $\beta$ en el duodeno de pacientes celíacos.....   | 100 |
| Figura 19. Mayor expresión de caspasa-4 en el intestino delgado de pacientes celíacos .....   | 101 |
| Figura 20. Aumento de la expresión de caspasa-1 activa en ratones tratados con p31-43.....  | 102 |
| Figura 21. Inducción de piroptosis en ratones tratados con p31-43 .....   | 103 |
| Figura 22. Aumento de la expresión de IL-1 $\beta$ activa en ratones tratados con p31-43.....   | 104 |
| Figura 23. Activación de GSDMD en ratones tratados con p31-43.....  | 105 |
| Figura 24. Disminución de la muerte celular en el intestino delgado proximal en ratones tratados con inhibidor de caspasa -1 previo a la administración de p31-43 ..... | 107 |
| Figura 25. Efecto de la inhibición de caspasa-1 en la muerte células epiteliales intestinales de animales tratados con p31-43.....                                      | 108 |
| Figura 26. Efecto de la inhibición de caspasa-1 en la activación del inflammasoma inducida por p31-43 .....   | 109 |
| Figura 27. Papel de NLRP3 en la inducción de muerte celular por p31-43.....   | 111 |
| Figura 28. Modificación de la expresión de mediadores de muerte celular por piroptosis en ratones tratados con inhibidor de NLRP3 .....                                 | 113 |
| Figura 29. Papel de IL-1 $\beta$ en la inducción de muerte celular por p31-43 .....   | 114 |
| Figura 30. Modificación de la expresión de marcadores de muerte celular por piroptosis en ratones tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ .....                       | 115 |
| Figura 31. Disminución de la muerte celular en el intestino delgado proximal después del tratamiento con un anticuerpo inhibidor de IL-1 $\beta$ y p31-43 .....         | 116 |
| Figura 32. Modificación de la expresión de mediadores de la vía apoptótica, en ratones tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ y p31-43.....                          | 117 |
| Figura 33. Mayor expresión de ZBP1 en mucosa duodenal de pacientes celíacos .....   | 129 |
| Figura 34. Mayor expresión de RIPK3 en el intestino delgado de pacientes celíacos .....   | 130 |
| Figura 35. Mayor expresión de p-MLKL en el intestino delgado de pacientes celíacos .....  | 131 |
| Figura 36. Caracterización de células p-MLKL <sup>+</sup> en la lamina propia del intestino delgado de pacientes celíacos.....  | 132 |
| Figura 37. Recuento de células CD45 <sup>+</sup> que expresan p-MLKL en lamina propia de pacientes celíacos .....   | 133 |
| Figura 38. Caracterización de poblaciones de células p-MLKL <sup>+</sup> en las criptas del intestino delgado de pacientes celíacos .....                               | 134 |
| Figura 39. Mayor expresión de RIPK3 en el intestino delgado de ratones tratados con p31-43  | 135 |

## Índice de tablas

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Tabla I. Modelos animales utilizados para el estudio de la enfermedad celíaca .....</i>                                 | <i>35</i> |
| <i>Tabla II. Anticuerpos utilizados para la técnica de WB y sus respectivas diluciones .....</i>                           | <i>44</i> |
| <i>Tabla III. Anticuerpos utilizados para estudios por microscopía de fluorescencia y sus respectivas diluciones .....</i> | <i>45</i> |
| <i>Tabla IV. Anticuerpos utilizados para comarcación con reacción de TUNEL y sus respectivas diluciones .....</i>          | <i>46</i> |
| <i>Tabla V. Listado de Secuencias de los cebadores utilizados en la técnica de RT-qPCR.....</i>                            | <i>47</i> |



# Introducción general

## **1. Tracto gastrointestinal y sistema inmune**

El cuerpo humano posee diversos epitelios en las superficies de las mucosas que forman barreras entre el medio ambiente y el medio interno. En particular, el tracto gastrointestinal alberga una de las áreas de interacción más grandes de estas barreras (aproximadamente 250 m<sup>2</sup>) y desempeña un papel fundamental en la regulación del sistema inmune y, por tanto, en la salud (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017; Turner, 2009).

La mucosa intestinal constituye uno de los sitios con mayor actividad inmunológica de nuestro organismo, por ser un punto de permanente contacto con microorganismos y antígenos alimentarios, actuando como una barrera selectiva a la vez que permite la absorción de nutrientes (Artis, 2008). Gracias al sistema inmune de mucosas la homeostasis intestinal, a pesar de su dinamismo y complejidad, se mantiene bajo control ya que se establece un estado altamente especializado permitiéndole reconocer y montar una respuesta regulada al enfrentarse a antígenos provenientes de la microbiota comensal o de la dieta (induciendo complejos mecanismos de tolerancia) o responder eficientemente a la presencia de microorganismos patógenos (generando potentes y efectivos mecanismos de protección) (Pabst & Mowat, 2012).

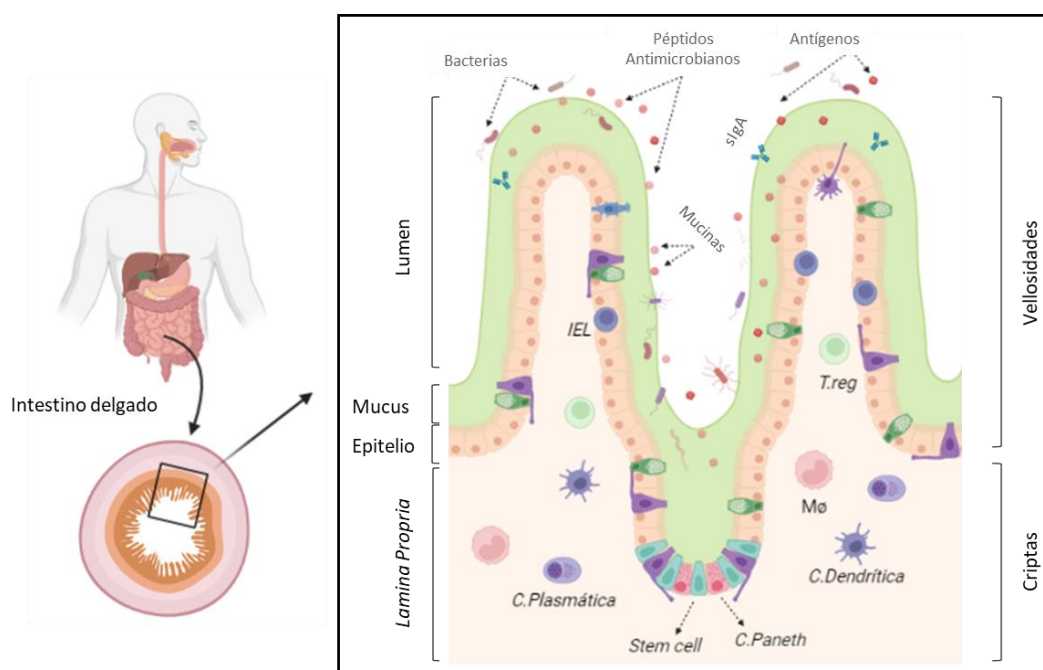
La mucosa intestinal está compuesta por varios elementos que ayudan en su función como barrera de defensa. Estos incluyen principalmente la capa externa de mucus junto con la microbiota intestinal, los péptidos antimicrobianos (AMPs) y la IgA secretada (sIgA). Además, presenta una capa de células epiteliales especializadas producto de la diferenciación de las "stem cells" en el fondo de las criptas que incluyen enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas, células de Paneth y células M (Salim & Söderholm, 2011), las cuales forman una monocapa continua y polarizada que separa el lumen de la *lamina propria* (Muniz et al., 2012; Turner, 2009).

La capa de mucus es la primera línea de defensa que las moléculas y microorganismos encuentran cuando llegan a la luz intestinal, siendo responsable de evitar el contacto directo con las células epiteliales (Turner, 2009). Está compuesta por proteínas de mucina altamente glicosiladas que forman una estructura de tamiz similar a un gel que recubre el epitelio intestinal (Pelaseyed et al., 2014). En el intestino delgado y grueso, la mucina 2 es la proteína más abundante secretada por las células caliciformes. El mucus, además, concentra AMPs producidos por las células de Paneth, e sIgA secretada por las células plasmáticas locales. Estos efectores son transportados por el enterocito hacia la luz intestinal y actúan sobre los microorganismos promoviendo su eliminación o bloqueando su adhesión y posterior invasión al epitelio (Johansson & Hansson, 2016). A su vez, el

transporte de moléculas a través del epitelio está muy regulado mediante estructuras multiproteicas que conforman las uniones estrechas (UE), uniones de anclaje y uniones comunicantes, principales miembros de la barrera intestinal (Ghosh et al., 2020; Turner, 2009) (Ver más adelante en Sección 2.5).

El tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal está formado por folículos linfoides, Placas de Peyer (conjunto de folículos linfoides, concentrados principalmente en la porción terminal del íleon), nódulos linfáticos mesentéricos y la *lamina propria* que alberga el sistema nervioso entérico, tejido conectivo, células del sistema inmune innato que incluyen células dendríticas, macrófagos, mastocitos, entre otras que determinan el control de la respuesta efectora o regulatoria y células de la inmunidad adaptativa tales como linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, en su mayoría diferenciadas a células plasmáticas productoras de IgA, y células regulatorias. El ingreso y egreso de las células del sistema inmune hacia el interior o exterior de la *lamina propria* se realiza a través de los numerosos vasos sanguíneos y linfáticos que alcanzan la mucosa, los cuales a su vez permiten la comunicación con otros sitios inductivos y efectores, manteniendo así la inmunidad local y sistémica (Ahluwalia et al., 2017).

En los folículos linfoides se inicia la respuesta inmune frente a los antígenos (Ags) que llegan principalmente a través de las células epiteliales o de las células M, estas últimas conforman el epitelio asociado al folículo y tienen la capacidad de traslocar eficientemente Ags sin degradarlos. Esas moléculas pueden ser captadas por células dendríticas que se encuentran en el domo de la placa de Peyer, pudiendo iniciar una respuesta local o migrar hacia un órgano linfoide, dependiendo del contexto de la respuesta. En condiciones homeostáticas, se favorecerá la inducción de la activación de linfocitos B para producir IgA, mientras que en condiciones inflamatorias o infecciosas se promoverá la respuesta efectora tanto local como en los órganos linfoides secundarios (Pietrzak et al., 2020).



**Ilustración 1. Anatomía y componentes de la mucosa intestinal**

*La mucosa intestinal se compone de una monocapa de células epiteliales polarizadas, así como de la región subepitelial, la lamina propia, que contiene numerosos elementos del sistema inmune. En el epitelio están presente enterocitos, células de Goblet (que sintetizan y liberan mucina), células de Paneth (que sintetizan péptidos antimicrobianos), células enterocromafines, (que producen ciertas hormonas), y las “stem cells” (encargadas de repoblar las diferentes poblaciones epiteliales). Por encima de la barrera epitelial se encuentra la capa de mucus que contiene microbiota, IgA secretora, mucinas y péptidos antimicrobianos. Los linfocitos intraepiteliales (IELs) se encuentran por encima de la membrana basal, dispuestos entre los enterocitos. La lamina propia contiene el tejido linfoide difuso compuesto de macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos B y T, también neutrófilos, mastocitos y eosinófilos.*

El tejido conectivo es el tejido adyacente al epitelio, en el que residen células del sistema inmune, neuronas, vasos sanguíneos y fibroblastos. Los fibroblastos mantienen la matriz extracelular, principalmente mediante la secreción de colágeno y metaloproteinasas, y ejercen un papel fundamental en la proliferación del epitelio intestinal.

Por último, el sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico coordinan las funciones digestivas y el mantenimiento de la homeostasis intestinal directamente a través de la liberación de neurotransmisores e, indirectamente, a través de la interacción neuro-inmunológica.

**2. Enfermedad celíaca. Características clínicas, diagnóstico y bases moleculares de su patogenia**

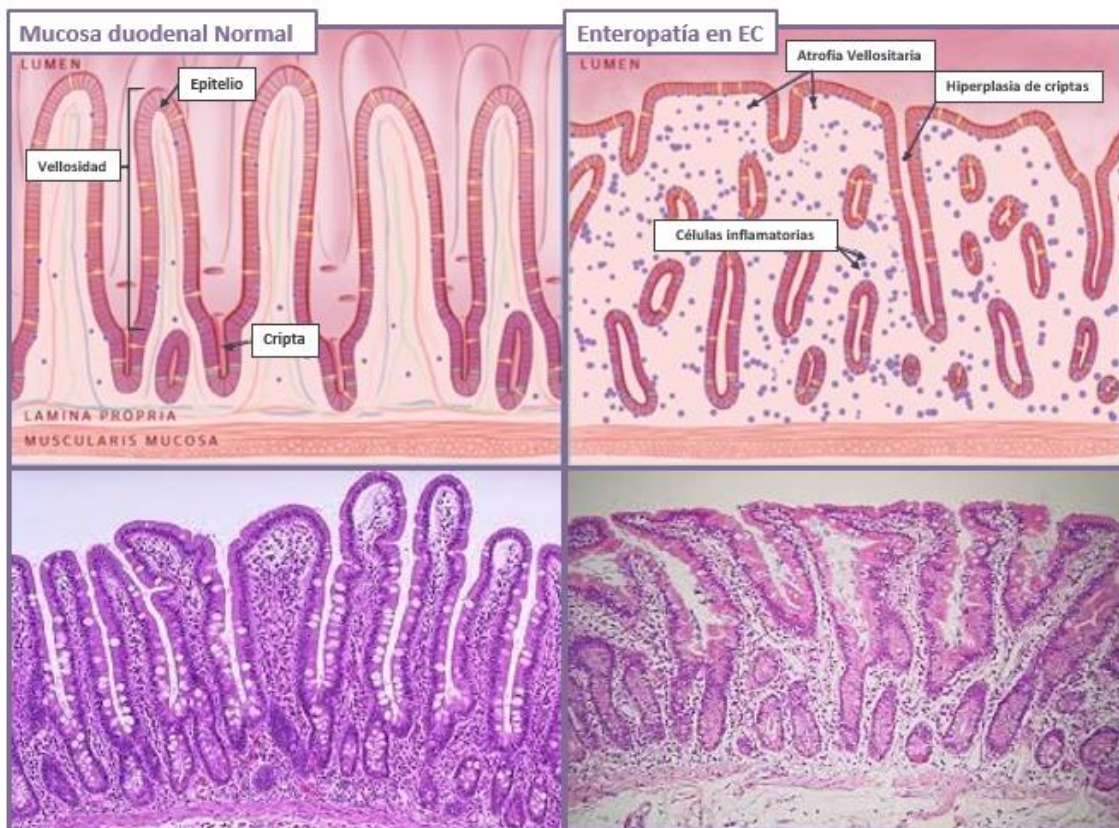
Las proteínas de trigo constituyen una de las fuentes más empleadas en alimentación humana por su utilidad en la formación de una masa panificable y otros alimentos básicos de nuestra dieta. Sus características bioquímicas le brindan propiedades únicas en la formación de una estructura viscoelástica, denominada gluten, obtenida por el amasado de la harina de trigo. En la estructura del gluten se encuentran las proteínas gliadinas y gluteninas, que en conjunto se denominan prolaminas, éstas son las responsables de conferir viscosidad, elasticidad y cohesividad a la masa (Wieser, 2007). A pesar de estar ampliamente distribuido el consumo de trigo, existe un alto número de personas, para las cuales estas proteínas, y sus homólogos de cereales relacionados evolutivamente (cebada, centeno y avena) son tóxicas.

La enfermedad celíaca (EC) es una enfermedad inmunomediada, multifactorial, que se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles ante la ingesta de este grupo de proteínas que forman el gluten. Es altamente prevalente y se estima que aproximadamente el 1% de la población general presenta la patología (Abadie et al., 2011; Singh et al., 2018; Lebwohl and Rubio-Tapia, 2021). De todas maneras, esta prevalencia es variable, probablemente debido a factores étnicos (composición genética), culturales (hábitos alimenticios) y ambientales (infecciones) (Abadie et al., 2011). En particular, en Argentina la

prevalencia dentro de la población pediátrica fue estimada en un 1,26% (Mora et al., 2012) y en la población adulta en un 0,6% (Gomez et al., 2001). Sin embargo, debe considerarse que, a pesar de los avances en cuanto a las estrategias de detección y conocimiento de la enfermedad, existe un elevado subdiagnóstico de la misma considerando que solo 1 de cada 5/7 pacientes son diagnosticados (Lindfors et al., 2019).

En la EC se produce daño en la mucosa del intestino delgado, caracterizado por la pérdida de la estructura de las vellosidades (que, en los cambios histológicos más severos, conduce a atrofia vellositaria), hiperplasia de criptas y un marcado infiltrado linfocitario, tanto a nivel de la *lamina propria* como en el compartimento intraepitelial (Marsh, 1992)(Ilustración 2).

Estos cambios conducen a la pérdida de la funcionalidad del intestino delgado y a un síndrome de malabsorción asociado a diversos signos clínicos que varían entre pacientes y, en especial, según el momento de presentación de la enfermedad.



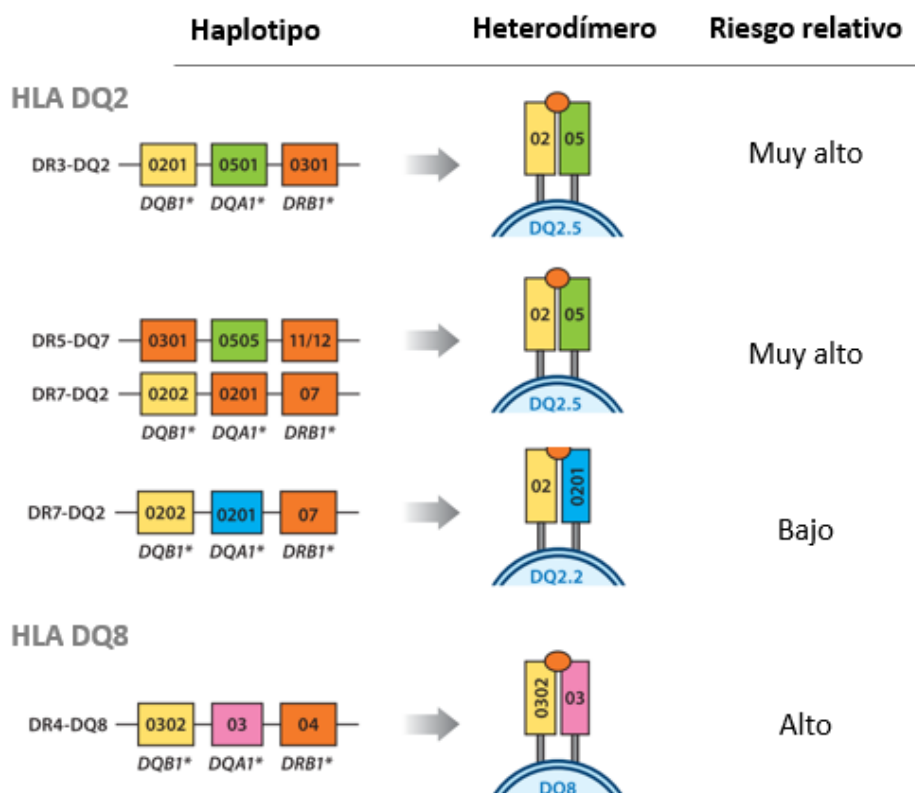
### **Ilustración 2. Histología de la mucosa duodenal**

Se muestra una ilustración y cortes histológicos de biopsias duodenales con tinción hematoxilina y eosina para una mucosa normal y con enteropatía severa, donde se evidencia la atrofia de vellosidades, engrosamiento de la lamina propria, incremento del infiltrado celular e hiperplasia de criptas. (Adaptada de Fasano et al, 2017).

En la mayoría de los casos, los cambios histológicos, y la sintomatología revierten cuando se establece una dieta de exclusión de las proteínas derivadas de gluten (dieta libre de gluten), que debe ser seguida en forma estricta y de por vida, siendo el único tratamiento efectivo. Solo una pequeña proporción de los pacientes no muestran una mejoría frente a la dieta, estando relacionado con una fuerte sospecha de una patología preneoplásica denominada EC refractaria (Ludvigsson & Murray, 2019).

## 2.1 Genética de la enfermedad celíaca

Como hemos mencionado el componente genético tiene un alto impacto en la prevalencia de la enfermedad. El locus de HLA es el principal factor de susceptibilidad genética en EC, en especial los alelos de susceptibilidad HLA-DQ2 y DQ8 poseen la mayor asociación encontrada en una patología de base inmune y casi la totalidad de los pacientes celíacos expresan uno u otro de ellos. Existen diferentes haplotipos asociados a diferentes grados de riesgo relativo. Los 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 observa una menor predisposición para los haplotipos codificantes del HLA-DQ8: “DR4-DQ8”: DQB1\*0302, DQA1\*03. Finalmente, 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 (Abadie et al., 2011; Sollid et al., 1989) (Ilustración 3).



**Ilustración 3. Factores genéticos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 asociados con la EC**

A la izquierda se muestran los posibles haplotipos asociados con la EC. A su lado, se muestran los heterodímeros resultantes, y a la derecha, el correspondiente grado relativo de predisposición con la enfermedad. (Modificado de Abadie et al., 2011).

Diferentes estudios revelaron que el HLA contribuye aproximadamente en un 30% a la predisposición genética total (Abadie et al., 2011). Por esta razón se han buscado otras regiones que se asocien con la patología puesto que es evidente la presencia de factores genéticos extra.

Debido al desarrollo de métodos de genotipificación masiva más económicos (GWAS e ImmunoChip) se han encontrado un total de 40 regiones asociadas a la enfermedad, tanto fuera como dentro de la región HLA. La gran mayoría de estos genes, asociados a múltiples loci en diferentes cromosomas, están relacionados con diversas funciones del sistema inmune tanto adaptativo como del innato, lo que apoya la idea de que la EC es producto de la interacción de una gran variedad de genes con bajo peso individual (Dieli-Crimi et al., 2015). Se debe destacar que un gran número de los genes implicados se encuentran relacionados con otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Abadie et al., 2011).

## 2.2 Diagnóstico

El diagnóstico de EC se basa en la observación clínica, estudios de serología y la evaluación histológica de piezas de intestino delgado. Si bien, en algunos casos, la sintomatología es muy sugestiva de la presencia de EC, en muchos otros es difusa, principalmente en adultos, dificultando el protocolo diagnóstico.

### 2.2.1 Sintomatología en la enfermedad celíaca

La sintomatología clásica, es la más frecuente (especialmente en niños) e incluye síntomas gastrointestinales asociados con un síndrome de malabsorción, ocasionado por la progresión de la enfermedad. Los pacientes presentan diarrea crónica, distensión abdominal, flatos fétidos, constipación, vómitos recurrentes, desnutrición, retraso en el crecimiento, baja talla y pérdida de peso.

En cambio, la sintomatología no clásica se presenta con manifestaciones extraintestinales secundarias a la malabsorción como anemia crónica (por deficiencia de hierro), hipocalcemia, atrofia muscular, problemas relacionados con la piel, hígado, las articulaciones, alteraciones del esmalte dental, coagulopatías, problemas cardíacos, neuropatías periféricas. En el caso de pacientes adultos se agrega, además, osteoporosis (por deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e infertilidad, que se cree estaría relacionada con problemas en la concentración de hierro, folatos, y zinc en sangre.

Es muy frecuente encontrar, además, pacientes asintomáticos o pacientes que cursan con signos subclínicos (cansancio, irritabilidad, depresión, cambios de humor, déficit de atención) que, como mencionamos, lleva a un gran número de pacientes sin diagnosticar (Husby & Murray, 2014; Ludvigsson et al., 2013; Parzanese et al., 2017).

### **2.2.2 Serología**

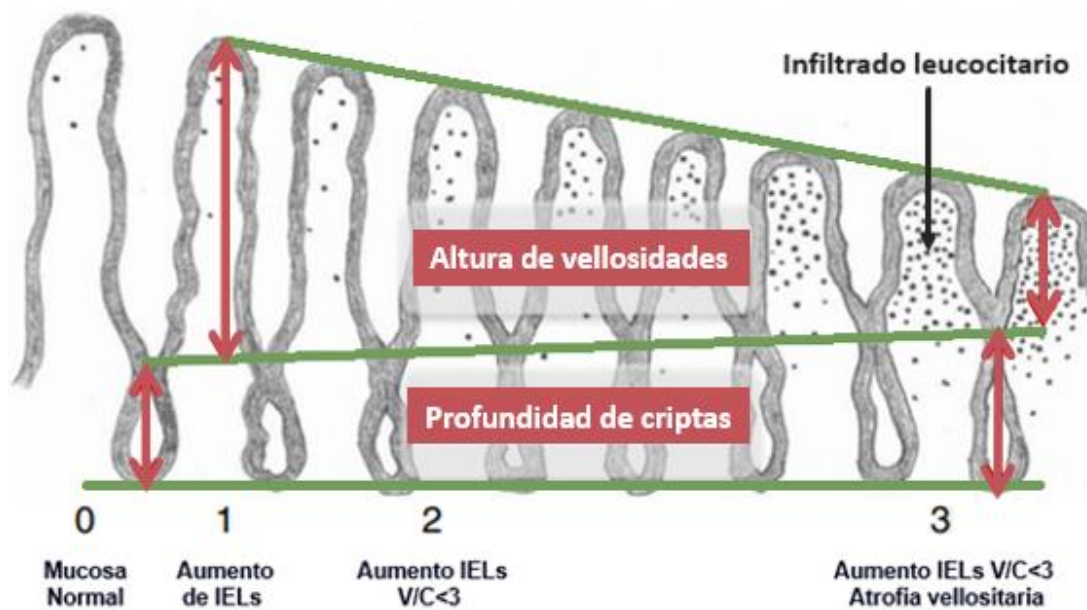
Los ensayos serológicos consisten en la detección de un panel anticuerpos en sangre periférica altamente selectivo para EC. Se emplea la evaluación por inmunofluorescencia de anticuerpos anti-endomisio (EMA) (isotipo IgA), mientras que por ELISA se evalúan anticuerpos anti-transglutaminasa 2 (TG2) (isotipo IgA o IgG), y anticuerpos anti-péptidos de gliadinas deamidados (DPG) (isotipos IgA o IgG). Entre los ensayos serológicos, los más utilizados son la detección de IgA anti-TG2 y IgG anti-DGP, que evaluados de manera conjunta son de muy alto nivel de predictividad, especialmente al ser aplicados a una población preseleccionada (por sospecha clínica o por familiaridad en primer grado de un caso diagnosticado) (Husby et al., 2019; Rashid & Lee, 2016).

Dado que la EC está asociada a la deficiencia de IgA, presentándose en el 1,3% de los pacientes celíacos, y siendo de 10 a 15 veces más común que en la población general (Kumar et al., 2002; Parzanese et al., 2017), en los estudios serológicos basados en la determinación de anticuerpos de isotipo IgA se debe considerar la posibilidad de resultados falsos negativos. Por ello, el protocolo diagnóstico incluye el dosaje de IgA total, para que en los casos con deficiencia se ponderen los resultados obtenidos con las determinaciones de anticuerpos de isotipo IgG (Villalta et al., 2010).

### **2.2.3 Evaluación histológica**

El diagnóstico confirmatorio de EC requiere la evaluación histológica de piezas de la mucosa duodenal ya que la presencia de enteropatía en el intestino delgado es considerada “gold standard” para el diagnóstico definitivo de la patología (Ludvigsson et al., 2013). Con este fin, se realiza una endoscopia alta para la toma de al menos 4 piezas de mucosa de intestino delgado correctamente orientadas procedentes de bulbo y segunda porción del intestino delgado. Durante la endoscopia se analiza la presencia de diferentes signos sugestivos de EC como disminución en número y altura de los pliegues duodenales, aspecto festoneado y patrón “en mosaico” o aspecto nodular de la mucosa (Ianiro et al., 2013).

La observación de atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y aumento en el número de linfocitos intraepiteliales (IELs) en las secciones histopatológicas de tejido constituyen la base del diagnóstico definitivo de EC. Para ello existen diversos sistemas de clasificación de las observaciones histológicas, uno de los más aceptados es el de Marsh - Oberhuber en la que se definen categorías de lesiones asociadas a EC: Pre-infiltrativa (Tipo 0); infiltrativa (Tipo 1); infiltrativa-hiperplásica (Tipo 2); atrofia leve (Tipo 3a), atrofia marcada (Tipo 3b) y atrofia total de las vellosidades (tipo 3c) (**Ilustración 4**).



#### **Ilustración 4. Histología en la enfermedad celíaca**

Esquema simplificado del score de enteropatía de Marsh-Oberhuber (Peña, 2015) que muestra la relación altura vellosidades/cripta (V/C) y el infiltrado linfocitario en todos los estados de la clasificación.

#### **2.2.4 Tipificación de alelos de susceptibilidad HLA**

Dado que EC es la enfermedad de base inmune que presenta el mayor riesgo relativo asociado a los alelos HLA de susceptibilidad (HLA-DQ2/DQ8), se ha sugerido la tipificación HLA como información complementaria en el protocolo diagnóstico. Estos alelos son muy frecuentes encontrándose aproximadamente en el 30% de la población general (Brown et al., 2019), por lo tanto, el mayor impacto en el diagnóstico son los casos HLA-DQ2/DQ8 negativos, ya que este es un fuerte criterio de exclusión de EC.

### **2.3 Patogenia en la enfermedad celíaca**

La EC se desencadena, en individuos genéticamente susceptibles, por una respuesta inmune exacerbada en el intestino delgado a un grupo de péptidos derivados del gluten. El rol central en el mecanismo de patogenia lo tienen los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de péptidos derivados de gluten restringidos a los alelos de susceptibilidad HLA-DQ2/DQ8 que producen abundantemente IFN $\gamma$ . Esta citoquina es responsable de múltiples efectos que conducen al daño de la mucosa del intestino delgado (Sollid & Jabri, 2013). (Ilustración 5).

Normalmente, las proteínas dietarias son digeridas por las enzimas del tracto gastrointestinal generando péptidos cortos que son absorbidos por los enterocitos mediante diversos mecanismos de transporte. Sin embargo, a diferencia de otras proteínas, los péptidos del gluten poseen secuencias muy particulares con alto contenido de aminoácidos glutamina y prolina que los hacen difícilmente digeribles por las enzimas



gastrointestinales y pancreáticas. Como consecuencia, se generan fragmentos largos que permanecen en el lumen del intestino y pueden ser transportados a través de la barrera intestinal (Ménard et al., 2010)(Ilustración 5-①).

El ingreso es facilitado por un mecanismo de pasaje selectivo mediado por CD71, molécula que une y transporta complejos gliadinas/anticuerpos IgA anti-gliadinas, que se forman en el lumen intestinal. CD71, se encuentra sobre-expresado en la superficie apical de los enterocitos en pacientes celíacos y media la internalización de estos complejos por vía endocítica. Estos complejos inmunes son transportados, con escasa degradación, para finalmente ser liberados en la *lamina propria* (Heyman et al., 2012).

La enzima transglutaminasa 2 (TG2), es capaz de deamidar selectivamente residuos de glutamina en determinadas posiciones de los péptidos derivados de gluten convirtiéndolos a ácido glutámico (Ilustración 5-②). Esta reacción genera un residuo con carga negativa que aumenta la afinidad de unión de los péptidos a las moléculas de HLA-DQ2 o DQ8, modificación que incrementa la capacidad de estimulación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos por las células dendríticas en la *lamina propria*. Recientes estudios evidenciaron que la TG2 puede encontrarse en la luz intestinal de pacientes con EC y que deriva de enterocitos que son desprendidos del epitelio. En la luz del intestino, estas células se desintegran y liberan componentes, entre ellos TG2, la que podría actuar tanto deamidando péptidos de gluten en el mismo lumen o, más probablemente, formando complejos por entrecruzamiento con los péptidos de gluten y favoreciendo de esta manera su captación por los enterocitos o las células M. Este mecanismo podría contribuir al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa en la EC (Iversen et al., 2020).

Los fragmentos peptídicos que atravesaron el epitelio son fagocitados y procesados por células dendríticas especializadas que los presentan en las moléculas de HLA-DQ2 o DQ8. Estas células se localizan en la *lamina propria* y migran a los órganos linfoides secundarios más cercanos (Ilustración 5-③).

En condiciones homeostáticas, las células dendríticas captan y procesan antígenos provenientes del lumen intestinal, migran a los ganglios mesentéricos donde activan linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes, diferenciándolos a linfocitos T regulatorios inducidos (células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>). Estas células recirculan hacia la *lamina propria* y allí, luego de ser reactivadas en forma específica, liberan citoquinas regulatorias (principalmente IL-10) con el fin de mantener la respuesta regulatoria frente a los antígenos lumbinales, dietarios o componentes de la microbiota (Pabst & Mowat, 2012).

En el intestino delgado de pacientes con enfermedad celíaca activa, las células dendríticas de la mucosa intestinal presentan un perfil proinflamatorio, e inducen la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia el perfil Th1 (Ilustración 5-④). La expansión clonal consecuente dará lugar a un conjunto de clones T específicos contra péptidos del gluten que migrarán a la mucosa intestinal donde al encontrar sus péptidos afines en un contexto de HLA adecuado, liberarán grandes cantidades de citoquinas inflamatorias, principalmente IFN $\gamma$

(Ilustración 5-⑤). Aún no se comprende completamente por qué los pacientes con EC desarrollan una respuesta Th1 contra péptidos derivados de gluten, pero se ha propuesto que la activación de la inmunidad innata promueve la diferenciación de las células dendríticas hacia dicho perfil.

El IFN $\gamma$  es la citoquina dominante en el proceso inflamatorio crónico y genera diferentes mecanismos efectores críticos en el daño del intestino delgado, entre ellos la activación de células citotóxicas presentes en la *lamina propria* y en el epitelio. También, incrementa la producción de metaloproteinasas, enzimas con fuerte actividad degradadora de proteínas de la matriz extracelular, que contribuyen al daño en la estructura del tejido (Abadie et al., 2011).

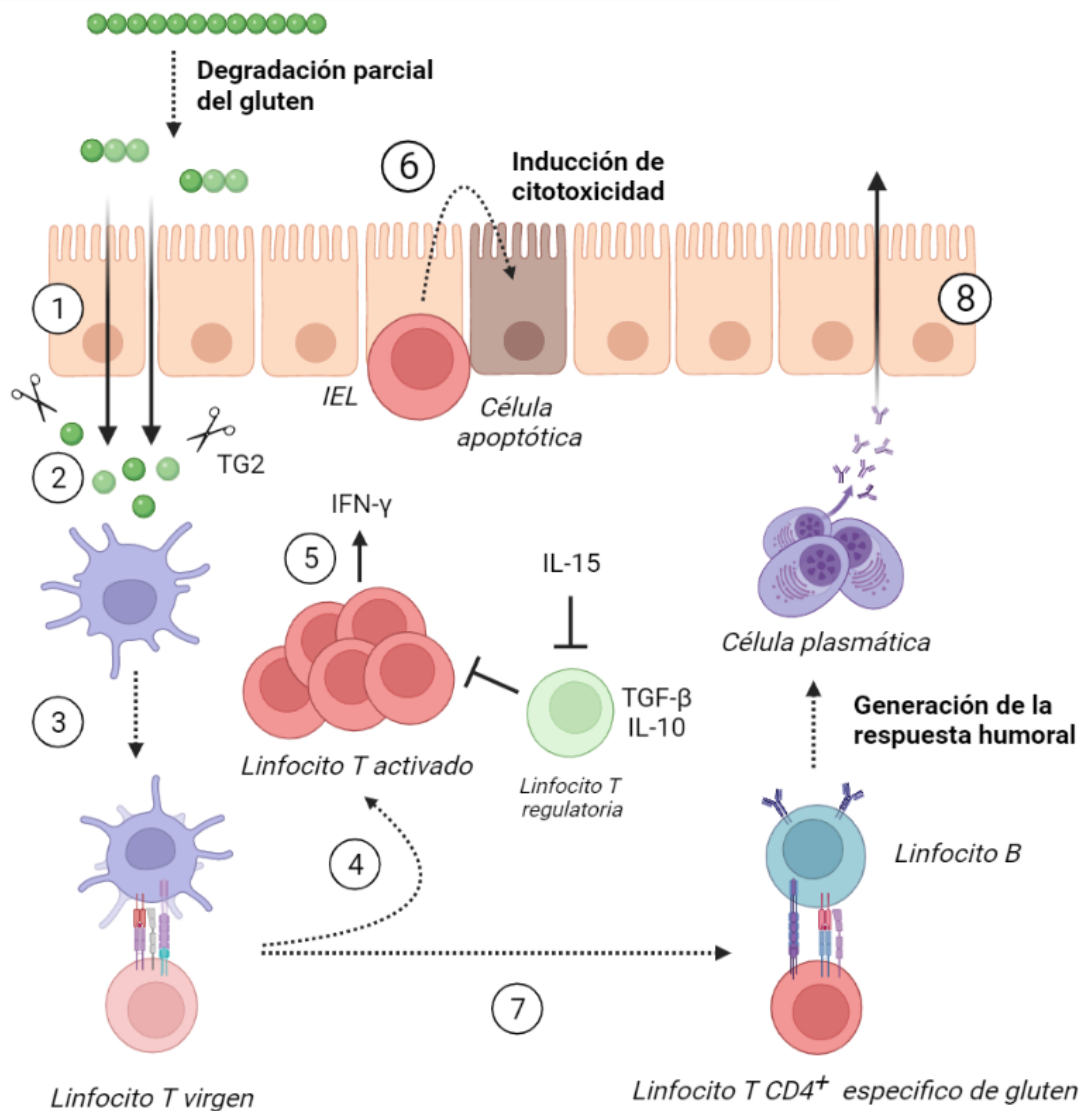
Los IELs, que están compuestos por linfocitos T CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup>, linfocitos T TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup>, y células NK, tienen como función mantener la integridad del epitelio induciendo muerte celular programada de enterocitos dañados o infectados mediante la vía de FAS o la degranulación de granzimas y perforinas. Estos expresan receptores de activación de células NK (NKR), tales como NKG2D y CD94/NKG2C, que reconocen moléculas de MHC I no clásicas (MICA/B y HLA-E) inducidas por estrés e inflamación (Jabri & Abadie, 2015), moléculas sobre-expresadas en los enterocitos de pacientes con EC (Allegretti et al., 2013), especialmente inducidas por IL-15. Esta citoquina, aumentada en duodeno de pacientes celíacos, incrementa la expresión de los NKR en los IELs y su actividad citotóxica, y a la vez, bloquea la función regulatoria de linfocitos Tregs interfiriendo la señalización de la vía de TGF- $\beta$  (Benahmed et al., 2007)(Ilustración 5-⑥).

Las infecciones virales (Bouziat et al., 2017), disbiosis, algunos componentes de la harina de trigo (como los inhibidores de tripsina) (Bellinghausen et al., 2019), o el péptido de gliadinas p31-43 (Chirido et al., 2021) han mostrado tener la capacidad de activar mediadores como: IL-15, TNF- $\alpha$  y los IFNs tipo I (Sollid & Jabri, 2013). Aunque IFN $\gamma$  e IL-15 son potentes activadores de la actividad citotóxica de los IELs, los mecanismos de inducción de muerte de enterocitos no son completamente comprendidos (Sollid & Jabri, 2013). Además, otros mediadores inflamatorios, como los IFNs de tipo I (di Sabatino et al., 2007) e IL-21 (van Leeuwen et al., 2013), por vías directas o indirectas, potencian la citotoxicidad.

En paralelo, en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios, las células T CD4<sup>+</sup> específicas del gluten activan y diferencian linfocitos B productores de anticuerpos anti-péptidos derivados de gluten y anticuerpos anti-TG2 (Ilustración 5-⑦). La formación de autoanticuerpos anti-TG2 es la primera demostración molecular del efecto carrier-hapteno en humanos. Este mecanismo se basa en la formación de complejos entre gliadinas y TG2 unidos covalentemente que son endocitados por linfocitos B específicos de TG2, los que procesarán y presentarán los péptidos de gliadinas en moléculas de HLA-DQ2/DQ8 permitiendo la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos que, a su vez, colaborarán en la activación del linfocito B para la diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-TG2 altamente selectivos de los pacientes celíacos (Ilustración 5-⑧), a los

cuales hasta el presente no se les ha encontrado un rol patogénico en la enteropatía (Abadie et al., 2011; Jabri & Abadie, 2015; Sollid & Jabri, 2013).

Una vez iniciada la respuesta adaptativa, se producirá una respuesta específica en la mucosa duodenal del paciente celíaco en respuesta al gluten derivado de la dieta. Dicha respuesta se desencadenará cada vez que el paciente consume proteínas de trigo, siendo esta la base de la dieta de exclusión completa como único tratamiento efectivo.



**Ilustración 5. Modelo resumido de la inmunopatogénesis en enfermedad celíaca**

Los péptidos derivados del gluten activan vías proinflamatorias en el epitelio, e inducen la expresión de IL-15, MICA y HLA-E. En forma directa o indirecta los péptidos derivados del gluten activan células dendríticas, las que luego migran al ganglio linfático mesentérico y presentan péptidos de gluten a linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos restringidos a HLA-DQ2 o DQ8. La TG2 genera péptidos deamidados de mayor afinidad por estas moléculas del HLA. Los

*linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados son fuertes secretores de IFN $\gamma$  y proveen señales de cooperación a linfocitos B específicos de TG2 o de péptidos de gluten y favorecen su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. La presencia de IFN $\gamma$  favorece el microambiente proinflamatorio y sensibiliza a los enterocitos ante la acción de IELs citotóxicos. Además los T CD4<sup>+</sup> activados potencian directamente la actividad citotóxica de IELs por IFN $\gamma$ , y también a través de la secreción de IL-21 y su acción sinérgica con IL-15 (no mostrado). La IL-15 incrementada inhibiría la acción de células T reguladoras (Treg) favoreciendo la activación de las células Th1.*

## **2.4 Desestabilización de las uniones estrechas en enfermedad celíaca**

Como hemos discutido anteriormente, los fragmentos de gluten parcialmente digeridos deben pasar la barrera epitelial y así llegar a la *lamina propria*, para ello existen diferentes maneras que incluyen el transporte paracelular a través de la barrera intestinal.

Los defectos de la barrera intestinal se han asociado con una amplia gama de enfermedades, que incluyen enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), carcinoma de colon, alergias alimentarias, pero también trastornos extraintestinales como enfermedad hepática crónica, diabetes mellitus tipo 1 y obesidad (Honda & Takeda, 2009; Izcue et al., 2009). Para todas estas enfermedades, comúnmente se plantea como hipótesis que la disfunción de la barrera intestinal provoca un flujo descontrolado de moléculas a través del epitelio, que pueden provocar una respuesta inmune exacerbada en individuos susceptibles y afectar el equilibrio microbiota-hospedador, iniciando mecanismos inflamatorios en el intestino o en tejidos distantes (Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

### **2.4.1 Complejos de unión intercelulares**

El transporte de moléculas a través del epitelio está muy regulado, mediante estructuras multiprotéicas que conforman las uniones estrechas (UE), uniones de anclaje y uniones comunicantes, principales miembros de la barrera intestinal (Ghosh et al., 2020; Groschwitz & Hogan, 2009; Turner, 2009) (**Ilustración 6**).

Las uniones estrechas son complejos adhesivos apicales que sellan el espacio intercelular y consisten en proteínas transmembrana (claudinas, ocludinas), proteínas adaptadoras (zonula occludens) y moléculas de adhesión (JAMs).

Aunque la mayoría de las proteínas que forman las UE sellan el espacio entre células y evitan el pasaje paracelular de solutos y agua (Quiros & Nusrat, 2014; Turner, 2009), algunas, en diferentes tejidos epiteliales, forman canales paracelulares con preferencia por cationes (claudin-2, -10b, -15), aniones (claudin-10a, -17) y agua (claudin-2) (Rosenthal et al., 2010).

Las claudinas son el principal factor que determina la función de barrera de las UE, controlando el paso de iones a través del espacio paracelular. Estas proteínas forman canales con propiedades biofísicas similares a los canales iónicos (Hartsock & Nelson, 2008).

Las ocludinas participan en el ensamblaje y desensamblaje de las UE. Su localización en la membrana está regulada por un proceso de fosforilación, desfosforilación de residuos específicos de Ser, Thr y Tyr. Cuando se encuentran fosforiladas establecen la UE, mientras que desfosforiladas se distribuyen en el citoplasma, por lo que la alteración en el patrón de fosforilación puede llevar a la desestabilización de las UE e incrementar la permeabilidad paracelular (Dörfel & Huber, 2012; Rao, 2009).

Las proteínas JAM son una superfamilia de inmunoglobulinas, las cuales se asocian lateralmente a otras proteínas en los contactos intercelulares para facilitar el ensamblaje y la formación de UE funcionales y polarizadas (Alizadeh et al., 2021).

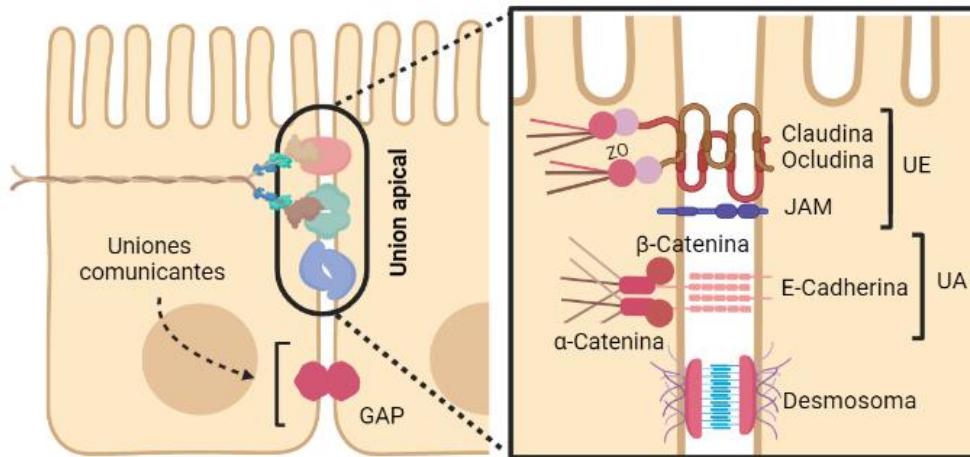
Las proteínas transmembrana de las UE se vinculan a las fibras de actomiosina del citoesqueleto a través de miembros de la familia de proteínas adaptadoras *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) que cumplen un papel relevante en la permeabilidad celular, así como en la regulación de la adhesión, en la formación y estabilización de las UE y en la transmisión de señales desde las uniones intercelulares hacia el interior de la célula para la regulación de procesos celulares, como la migración celular (Umeda et al., 2006).

Las uniones adherentes (UA) se encuentran debajo de las UE y son necesarias para su correcta estructura. Se generan a través de moléculas de adhesión transmembrana de la superfamilia de las cadherinas y cateninas. Los dominios extracelulares de las cadherinas median interacciones homofílicas, dependientes de calcio extracelular con cadherinas de células adyacentes mientras que el dominio citoplasmático interacciona con el citoesqueleto a través de su unión con  $\alpha$  y  $\beta$  cateninas (Nagafuchi, 2001).

Las UA junto con los desmosomas, proporcionan fuertes enlaces adhesivos célula-célula para mantener la integridad del epitelio formando las uniones de anclaje.

Tanto las UE como las uniones adherentes están vinculados al anillo de actina y miosina que permite la regulación de las uniones a través del citoesqueleto (Groschwitz & Hogan, 2009). Varias proteínas reguladoras pueden afectar este componente estructural, como factores de crecimiento y proteínas reguladoras de la actina (Rho, GTPasas, miosina).

Finalmente, las uniones comunicantes permiten la comunicación entre los citoplasmas de las células vecinas a través de la formación de un canal que atraviesa las membranas. Están formados por 6 proteínas transmembrana llamadas conexinas, que median el intercambio recíproco de iones y moléculas pequeñas de menos de 1 kDa.



### **Ilustración 6. Representación de las uniones intercelulares en el epitelio intestinal**

Los complejos de unión intercelulares, compuestos por uniones estrechas, uniones adherentes, uniones comunicantes y desmosomas, son estructuras dinámicas que restringen el paso de macromoléculas. La integridad y la estructura de la célula epitelial es modulada, en gran parte por el citoesqueleto, principalmente por actina, miosina y filamentos intermedios. Se indica en detalle el complejo de unión apical: las uniones estrechas se componen principalmente de claudinas, ocludinas y proteínas JAM, las cuales se asocian a las zonula ocludens que las conectan con el citoesqueleto. Las uniones adherentes se componen de cadherinas, como la E-cadherina, la cual se une a las cateninas ( $\alpha$  y  $\beta$  cateninas) que también, las conectan con el citoesqueleto.

#### **2.4.2 Contribución al Ingreso de los fragmentos de gluten**

En condiciones fisiológicas, el transporte de proteínas o componentes de gran tamaño, como los péptidos derivados del gluten, a la *lamina propria* es limitado. Esto no sucede en pacientes con EC activa donde la alteración de las uniones estrechas conduce a una mayor permeabilidad (Heyman et al., 2012). No es sencillo definir si esta alteración contribuye al desarrollo de la enfermedad o si es simplemente un fenómeno secundario a la respuesta inflamatoria crónica (Schumann et al., 2017).

En diversas condiciones patológicas, el transporte paracelular selectivo de solutos puede incrementarse como resultado de la disregulación en la expresión de moléculas asociadas a la función de barrera, como la disminución de las claudinas que estabilizan las uniones y el aumento de las formadoras de canales (Krug et al., 2014). Es por ello que la barrera intestinal no debe considerarse como una estructura estática, sino que es muy dinámica, y estímulos tanto internos como exógenos (por ejemplo, citoquinas, bacterias, factores de la dieta) modifican la expresión y estructura de sus componentes (Turner, 2009).

En la mucosa del intestino delgado de pacientes celíacos, se evidenció una regulación negativa de las claudinas formadoras de las barreras como claudina-3, -5 y -7 y en paralelo, un incremento de claudina-2 y -15, formadoras de poros (Schumann et al., 2017). Se ha

observado, además, que los péptidos derivados de gluten aumentan la permeabilidad intestinal mediante la liberación de zonulina que produce una alteración estructural en las uniones estrechas (Fasano, 2011). A su vez, proteínas que participan en la reparación del epitelio durante eventos apoptóticos masivos, como E-Cadherina, se encuentran disminuidas en el epitelio de pacientes celíacos no tratados, por efecto de citoquinas inflamatorias como IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Ciccocioppo et al., 2006; Lubkov & Bar-Sagi, 2014).

Siguiendo esta línea, un estudio genético en pacientes celíacos de Holanda y Reino Unido, mostró que los genes PARD3 y MAGI2, relevantes en la polarización de las células epiteliales, la estructura de las uniones estrechas, y la reorganización de la F-actina en el citoesqueleto de los enterocitos, estaban asociados a la patología (Wapenaar et al., 2008; Schumann et al., 2017). Estos hallazgos demostraron que no solo el aumento de la permeabilidad intestinal de los celíacos se debía a los efectos de la respuesta inmune contra el gluten, a cargo de IFN $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  sino que también genes con roles importantes en el armado de las uniones estrechas estarían involucrados en la patogenia de la enfermedad.

Esta alteración de la barrera epitelial puede asociarse también a la amplificación de la respuesta inflamatoria, por aumentar el ingreso de microorganismos y componentes proinflamatorios, como LPS, flagelina, y otros MAMPs a la mucosa.

### **3. Mecanismos de muerte celular programada**

Apoptosis, piroptosis, y necroptosis conforman los principales mecanismos de muerte celular programada (PCD) que determinan la muerte o supervivencia de las células de nuestro organismo. Cuando el equilibrio se altera, estas vías juegan un papel clave en la decisión final al momento de determinar el destino de las células.

En el caso del intestino delgado, los enterocitos envejecidos sufren procesos de PCD, controlados de manera estricta para mantener la integridad de la barrera epitelial, siendo extruidos hacia la luz intestinal. La activación, regulación y entrecruzamiento entre estas vías se vuelve de extremo interés tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta a una infección o inflamación local, donde la muerte de los enterocitos puede potenciarse como consecuencia directa de un patógeno o producto de la respuesta inflamatoria, causando la pérdida de la integridad de la barrera y consecuentemente la exposición a MAMPs potenciando el reclutamiento y la activación de células inmunes inflamatorias. En relación con este último punto, aún no se conocen completamente los mecanismos responsables de la PCD durante la inflamación, mientras que, por el contrario, los mecanismos que operan en condiciones fisiológicas están ampliamente descriptos.

La apoptosis, representa la forma más estudiada de PCD y es el mecanismo de elección cuando se deben eliminar células en forma masiva ya que no induce inflamación debido a que no se produce liberación del contenido celular al medio. Por estas características es el principal mecanismo por el cual los enterocitos dañados mueren en el intestino sano (Potten, 1997). Sin embargo, en otros mecanismos de PCD como piroptosis y necroptosis,

se producen poros en la membrana celular por medio de los cuales el material citoplasmático puede salir al medio y provocar una respuesta inflamatoria (Kesavardhana et al., 2020). Este material liberado, contiene DAMPs y alarminas que, por ejemplo, activan respuestas inflamatorias en el intestino grueso y están implicadas en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Tartey & Kanneganti, 2020).

Los diferentes mecanismos de PCD: apoptosis (PCD mediada por el apoptosoma y caspasas ejecutoras), piroptosis (PCD dependiente del inflammasoma y ejecutada por miembros de la familia de gasdermina) y necroptosis (PCD mediada por RIPK3 y el efector aguas abajo MLKL), tienen elementos reguladores y efectores únicos, que median el control de estas vías (Kesavardhana et al., 2020).

De hecho, se ha planteado que, debido a las redundancias encontradas, estas podrían estar interrelacionadas, conservadas evolutivamente, y ser originadas en una señal común, denominada PANoptosis, que luego mediaría el disparo de las distintas vías. Este modelo propone el rol de un complejo multiproteico, llamado PANoptosoma, en el que participa ZBP1 junto con otras proteínas como: RIPK1, RIPK3, ASC, NLRP3, Caspasa-8, Caspasa-1, A20, TAK1, entre otras (Samir et al., 2020). El control de estas vías sería diferente en cada situación y podría depender de distintos mecanismos reguladores, proteínas inhibidoras, predisposición genética, contexto celular específico y factores ambientales. El PANoptosoma, modelo propuesto recientemente, sería crítico en diferentes situaciones, como enfermedades neurodegenerativas, cáncer, inflamación provocada por infecciones, inflamación de las articulaciones e inflamación metabólica (Kesavardhana & Kanneganti, 2017; Kuriakose & Kanneganti, 2018; Samir et al., 2020).

### **3.1 Muerte celular en mucosa intestinal en enfermedad celíaca**

Las células epiteliales tienen la mayor tasa de renovación del organismo. Este proceso permite la rápida remoción y reemplazo de las células dañadas para mantener la integridad del epitelio.

Los enterocitos mueren por apoptosis y se eliminan por un proceso de extrusión celular hacia el lumen, denominado anoikis, inducido por esfingosina 1 fosfato que, mediante su receptor, activa el citoesqueleto y genera un anillo de miosina en la región basal conduciendo a la pérdida de adherencia del enterocito a la membrana basal. Este proceso ocurre en simultáneo con un mecanismo de relocalización de células vecinas que mantiene sellada la barrera epitelial, permitiendo el mantenimiento de la integridad y debe ser estrictamente regulado ya que la alteración de la eliminación de células muertas conduce a fallas en la remodelación del epitelio, y confiere un mayor riesgo de infección, o aparición de patologías inflamatorias crónicas o tumores (Gudipaty & Rosenblatt, 2017).

En la patogenia de EC el daño histológico causado por células citotóxicas, y la presencia de mediadores inflamatorios se asocia a un incremento de la muerte celular programada (Perez et al., 2021; Shalimar et al., 2013).



Como ya hemos mencionado, en EC, existe una activa remodelación de la mucosa intestinal acompañada por un aumento de la tasa de muerte de los enterocitos (Abadie et al., 2011; Ludvigsson et al., 2013). Diferentes estudios han mostrado que esta muerte ocurre por apoptosis inducida por citotoxicidad mediada por los IELs, siendo los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de péptidos de gluten presentes en *lamina propria*, los que producen IFN $\gamma$  que potencian la actividad citotóxica (Pietz et al., 2017; Sabatino et al., 2001). Aunque es claro que la apoptosis es un mecanismo relevante en la eliminación masiva de estas células, no se han realizado estudios detallados de la contribución de otras vías de muerte celular programada en EC.

Este aspecto es de relevancia en la comprensión de los mecanismos que se encuentran activos en el intestino delgado, donde existe una inflamación crónica y se observa estrés biológico (oxidativo, y de retículo) (Barone et al., 2014). Nuestro grupo de investigación evidenció el estrés celular al demostrar un aumento en la expresión de moléculas MICA/B (moléculas de HLA clase I no convencional) en epitelio, células plasmáticas y linfocitos T tanto del compartimiento intraepitelial como de la *lamina propria* en el intestino delgado de pacientes con EC (Allegretti et al., 2013).

Cuando la inflamación no está controlada, como sucede en EC, puede provocar la pérdida de la integridad de la barrera y la exposición a patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs), lo que potencia el reclutamiento y la activación de células inmune inflamatorias (Thoo et al., 2019). Por lo tanto, sería importante comprender cómo mueren las células epiteliales en respuesta a la inflamación y explorar si este proceso varía de las vías no inflamatorias, que caracterizan al intestino sano, a vías proinflamatorias (Kesavardhana et al., 2020).

Diversas vías inflamatorias están involucradas en la patogenia de EC, en especial, la vía de los interferones IFNs/JAK/STATs (Jarry et al., 2017). Estas vías, participan en la regulación de las vías de muerte celular proinflamatorias involucradas en la liberación al medio extracelular de alarminas (Sarhan et al., 2018) que se han demostrado relevantes en patologías intestinales como enfermedad de Crohn (Günther et al., 2019).

Se ha mostrado que los IFNs tipo I participan en el control de la muerte celular por apoptosis y piroptosis en enterocitos de pacientes celíacos (Jarry et al., 2017) pero, a pesar de estas observaciones, se ignoran las consecuencias funcionales de la liberación de alarminas como IL-33 (Perez et al., 2020), HMGB1 (Manti et al., 2017), o IL-1 $\beta$  (K. Harris et al., 2008) que se han encontrado aumentadas en EC activa. Estos mediadores, amplifican la respuesta inflamatoria inicial, estimulando la respuesta inmune Tipo 1 y/o la respuesta citotóxica. La respuesta citotóxica induce apoptosis de las células estresadas debido al ambiente inflamatorio y el conjunto de estas respuestas inducidas conduce al daño histológico del intestino delgado de los pacientes celíacos activos.

Como ya se ha mencionado, la patogenia de la EC se basa en la generación de células T, de perfil Th1, específicas de 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- $\alpha$  (Abadie et al., 2011), moléculas capaces de generar un ambiente inflamatorio con inducción de vías de muerte celular proinflamatoria como piroptosis y necroptosis. De esta forma, se generan entonces respuestas antagónicas, la apoptosis por un lado produciría respuestas tolerogénicas, mientras que los eventos derivados de muerte por necroptosis y piroptosis inducirían respuestas proinflamatorias.

*Todos estos aspectos son centrales a este trabajo de tesis y serán desarrollados en forma detallada en los capítulos específicos.*

#### **4. Modelos murinos para el estudio de enfermedad celíaca**

Con la finalidad de comprender la patogenia de la enfermedad celíaca y el desarrollo de terapias farmacológicas se han utilizado diversos modelos experimentales incluyendo ensayos *in-vitro*, *in-vivo* y *ex-vivo*.

A pesar de los esfuerzos realizados, hasta el momento no se ha logrado desarrollar un modelo animal que reproduzca en su totalidad los cambios histológicos, moleculares y celulares observados en la enfermedad celíaca. Los modelos animales descritos, detallados en la **Tabla I**, permiten estudiar solo algunas de las etapas de la patología, en particular la respuesta adaptativa, contribuyendo de manera parcial a entender el rol de distintas moléculas y células claves en la patogenia de la enfermedad (Stoven et al., 2013).

Entre los modelos existentes debemos destacar el basado en el uso de ratones C57BL/6 transgénicos: HLA-DQ8-Dd-villin-IL-15tg, por ser 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* en ratones alimentados con una dieta rica en gluten, presentándose una enteropatía limitada a la administración de gluten, con respuesta celular y humoral contra péptidos de gluten y contra la enzima TG2 (Abadie et al., 2020).

También es de importancia hacer hincapié en el modelo experimental en ratón, desarrollado por nuestro grupo de trabajo, que se utilizará en el desarrollo de esta tesis, el cual, 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) y que desarrollaremos más adelante (*ver sección 4.2*).

**Tabla I. Modelos animales utilizados para el estudio de la enfermedad celíaca**

| Descripción  | Aspecto a modelar  | Comentario   | Referencias                                     |
|--|--|--|---|
| <b>Modelo inducido, desafío oral con p31-43 en ratones C57BL/6</b>   | Enteropatía (Relación V/C, aumento de IELs) inducción de la vía de IFNs por péptido derivado de gliadina.                                    | El péptido p31-43 induce enteropatía leve caracterizada por incremento de IFN $\gamma$ , IFN $\beta$ , IL-1 $\beta$ , aumento de IELs y reducción de la relación V/C.  | (Araya et al., 2016; Gómez Castro et al., 2019) |
| <b>Modelo inducido, infección con Rotavirus T1L en C57BL/6</b>   | Pérdida 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 con daño a la mucosa intestinal.   | (Bouziat et al., 2017)                          |
| <b>Modelo espontáneo en perro</b>  | Enteropatía debido al consumo de gluten.   | La enteropatía no está asociada a un haplotipo MHC II.   | (Garden et al., 2000)                           |
| <b>Modelo espontáneo en primate (Rhesus)</b>   | Modelo de sensibilidad al gluten en primates.  | Desarrollan enteropatía no dependiente de MHC II, y en otros casos dermatitis, pero sin enteropatía.   | (Bethune et al., 2008)                          |
| <b>Modelo espontáneo en Ratos Wistar AVN</b>   | Enteropatía (disminución de la relación V/C y aumento de IELs) 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 et al., 1996)                       |
| <b>Cepas de bacteria de <i>P. aeruginosa</i>, o de enzimas provenientes de esta bacteria en ratones C57BL/6 transgénico para DQ8</b> | 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, et al., 2019)            |
| <b>Microbiota en ratones C57BL/6 transgénicos para la HLA-DQ8 infectados con rotavirus T1L</b>                                       | Pérdida 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 et al., 2017)                          |
| <b>Ratones transgénicos DQ8-Dd-villin-IL-15tg</b>  | Enteropatía con generación 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 et al., 2020)                           |

Disponer de modelos animales representa una ventaja a la hora de estudiar etapas tempranas de la patogenia que no pueden ser evaluadas sobre muestras humanas debido a que al momento del diagnóstico el paciente ya ha desarrollado por un periodo prolongado y variable la patología. Se propone que los mecanismos desarrollados en las etapas iniciales condicionarían no solo el desencadenamiento de la EC, sino que determinarían las formas de presentación clínica, así como el disparo de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes.

#### **4.1 Estudios de mecanismos de la inmunidad innata en enfermedad celíaca**

Los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa involucrados en la patogenia de EC han sido intensamente estudiados. Se conocen con gran detalle desde las secuencias que constituyen los epitopes T presentados por las moléculas de HLA-DQ2/-DQ8, el rol de la enzima TG2, y los clones T dominantes (Sollid et al., 1989). Entre los péptidos inmunogénicos más estudiados se destaca el denominado 33mer (p58-82), que se genera a partir de  $\alpha$ 2-gliadinas por la digestión de enzimas gastro-pancreáticas, esta secuencia contiene 6 epitopes T superpuestos y es resistente a la digestión de las enzimas del ribete en cepillo de la membrana del enterocito (Shan et al. 2005).

Además de actuar en la inmunidad adaptativa, los péptidos de gliadinas son capaces de generar una respuesta innata en la que pueden participar tanto el epitelio como células presentes en la *lamina propria*: monocitos/macrófagos y células dendríticas. Esta respuesta inflamatoria conduce a la activación de linfocitos intraepiteliales, entre otros fenómenos.

Los fragmentos de gliadinas pueden también tener funciones no asociadas a la respuesta específica de linfocitos T, pero inducir diferentes tipos de efectos tóxicos (Chirdo et al., 2021). De hecho, el p31-43 (LGQQQPFPPQQPY) de  $\alpha$ -gliadinas no se une a las moléculas de los alelos de susceptibilidad clase II (HLA-DQ2/DQ8) (Calvanese et al., 2019). Los primeros estudios realizados empleando piezas de biopsias duodenales de pacientes celíacos en tratamiento estimuladas con p31-43 mostraron la inducción de diferentes mediadores inflamatorios y daño a la mucosa (Maiuri, 2003).

A partir de la digestión enzimática de  $\alpha$ -gliadinas en el tracto digestivo, se genera el péptido p31-55 que contiene al p31-43. Este último sólo se libera cuando además de las enzimas pancreáticas también actúan las del ribete en cepillo (Ferranti et al., 2007).

El p31-43 representa un péptido modelo de interés para el estudio de los mecanismos de la respuesta innata de EC. Mediante ensayos *ex vivo*, incubando biopsias duodenales, se observó que el p31-43 induce la expresión de IL-15 y genera apoptosis de enterocitos (Maiuri L, 2003). Además, produce aumento de la permeabilidad intestinal, dependiente de la molécula MyD88 en un modelo experimental empleando ratones C57BL/6 (Thomas et al., 2006) y se acumula en lisosomas tempranos de enterocitos, generando un persistente estrés oxidativo (Luciani et al. 2010).

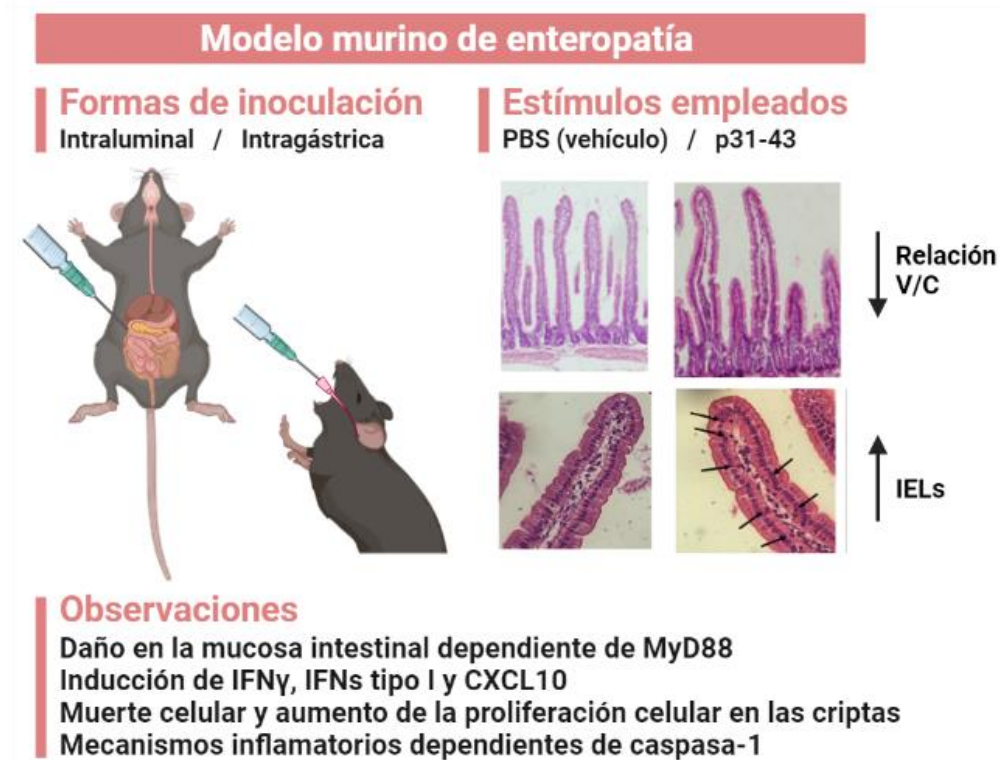
Múltiples efectos biológicos han sido descritos para este péptido (Chirido et al., 2021), sin embargo, no se ha podido identificar un receptor responsable de su ingreso a la célula. Se demostró que se une a una subunidad del canal del anión Cl<sup>-</sup> (CFTR) e inhibe su función, dado que promueve la conformación cerrada del canal (Maiuri et al., 2019). Esta inhibición tiene implicancias directas sobre la función de las células epiteliales, promoviendo una respuesta inflamatoria que involucra la activación de la vía NF- $\kappa$ B, inducción de TG2, producción de IL-15 y liberación de IL-1 $\beta$ .

Con el fin de estudiar los mecanismos inflamatorios generados por p31-43, en trabajos previos de nuestro grupo, se desarrolló un modelo experimental de enteropatía en ratones C57BL/6. Para asegurar que el p31-43 interaccionara con la mucosa del intestino delgado proximal, se optimizó una técnica de administración intraluminal por microcirugía donde se observó que el p31-43 produce daño en la mucosa intestinal dependiente de MyD88, acompañado por inducción de IFN $\gamma$ , IFNs tipo I y CXCL10, muerte celular y aumento de la proliferación celular en las criptas (Araya et al., 2016). Además, como se estima que en la patogenia de EC varios factores ambientales como las infecciones virales podrían tener su efecto, se incluyó también en el estudio un estímulo combinado con poly I:C como agonista de TLR3 buscando imitar los mecanismos tempranos en la inducción de enteropatía por infecciones virales que podrían predisponer a una respuesta exacerbada a un antígeno dietario.

Este modelo con p31-43 fue refinado logrando evidenciar daño mediante la administración intragástrica (Gómez Castro et al., 2019), la cual solo requiere un buen manejo técnico por parte del operador y si es realizada de manera correcta es indolora para el animal. Además, no requiere el uso de un equipamiento complejo por lo que facilita su traslado a distintos laboratorios de investigación.

Empleando péptidos de síntesis con secuencia invertida o al azar, demostramos que los efectos del p31-43 son específicos de secuencia. Se evidenció que el daño en la mucosa intestinal producido por p31-43 administrado en forma intragástrica, depende de MyD88 y de la vía de IFNs tipo I, pero no de TLR4 y que caspasa-1 es necesaria en los mecanismos inflamatorios sugiriendo que el inflamasoma NLRP3 estaría involucrado (Gómez Castro et al., 2019) (**Ilustración 7**).

Este modelo, en definitiva, constituye una herramienta útil para el estudio de los mecanismos inflamatorios que pueden asociarse a la generación de procesos crónicos en la mucosa del intestino delgado y finalmente conducir al desencadenamiento de EC en individuos genéticamente susceptibles.



**Ilustración 7. Modelo murino de enteropatía por la administración de p31-43**

En la ilustración se observa la evolución del modelo de una administración intraluminal a una intragástrica, los estímulos empleados para simular la enteropatía y las principales observaciones documentadas en el modelo.

## Hipótesis

La apoptosis, y vías proinflamatorias de muerte celular como piroptosis y necroptosis, están sobre-activadas en la mucosa duodenal de pacientes celíacos siendo responsables de la respuesta inflamatoria y el daño tisular.

## Objetivos

Los mecanismos de la inmunidad adaptativa, que participan en la patogenia de EC, han sido extensamente estudiados y descritos con detalle (Sollid & Jabri, 2013). Sin embargo, aún existen aspectos esenciales asociados a las etapas tempranas, los factores que la desencadenan y los mecanismos de daño de la mucosa intestinal que se desconocen.

El objetivo de este trabajo es establecer si existe muerte celular incrementada en la mucosa intestinal en EC, cuáles son los tipos celulares más afectados y qué mecanismos están involucrados. Para ello, además de contar con biopsias duodenales de pacientes celíacos y controles, emplearemos un modelo murino de inflamación intestinal inducida por la administración intragástrica de un péptido de gliadinas.

## Objetivos específicos

- Estudiar los mecanismos de muerte celular programada en la mucosa del intestino delgado humano en el contexto de la enfermedad celíaca.
- Analizar las vías de muerte celular programada en la mucosa intestinal inducidas por el péptido p31-43 en un modelo experimental de enteropatía.
- Evaluar similitudes entre los procesos observados en intestino delgado humano y en el modelo experimental en ratón.

Estos estudios permitirán avanzar en el conocimiento de la biología de la mucosa del intestino delgado, pudiendo ser utilizados en la prevención de la EC o bien en la implementación de estrategias terapéuticas que reduzcan la progresión o severidad de las complicaciones a largo plazo y el desencadenamiento de las enfermedades asociadas.

# Materiales y Métodos

## **1. Obtención de Muestras Humanas**

Las biopsias duodenales tanto de pacientes pediátricos como adultos se obtuvieron durante el procedimiento diagnóstico de rutina para enfermedades gastro-intestinales. Las mismas fueron provistas por los servicios de gastroenterología del “Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor María Ludovica” y el “Hospital Interzonal de Agudos General José de San Martín” respectivamente, ambos ubicados en la ciudad de La Plata.

El estudio fue aprobado por los Comités Éticos de ambas Instituciones de salud pública y se realizó de acuerdo con las pautas experimentales en humanos. La investigación clínica se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, los participantes dieron su consentimiento informado y se identificaron solo por número.

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 el personal médico de los servicios mencionados. Durante la toma de las muestras, aquellas destinadas al análisis de expresión génica se conservaron en RNAlater (Ambion, cat AM7020), transportaron en frío y fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las que se utilizarían para la técnica de western blot fueron colocadas inmediatamente en hielo seco dentro de un criotubo vacío y pasadas a nitrógeno líquido una vez en el laboratorio hasta el momento de procesarse. Los cuidados en la manipulación debieron extremarse en estas muestras debido a que era necesario reducir al máximo los procesos de muerte desencadenados al momento de extraer la biopsia. Para cada paciente se obtuvo una biopsia adicional que fue fijada en formol y posteriormente incluida en parafina para el análisis por inmunofluorescencia o la realización de técnicas como TUNEL.

El diagnóstico de EC se realizó considerando el examen histológico de biopsias duodenales, el análisis serológico y la evaluación de la presentación clínica.

Siendo la población celíaca (EC) positiva para anticuerpos TG2 (tipo IgA) o DPG (IgG), con signos endoscópicos relacionados con la enfermedad y presentando una histología con enteropatía superior al Marsh I. Los individuos pertenecientes a la población control (NC) fueron sometidos al estudio endoscópico por razones ajenas a la EC (principalmente por ingesta de cuerpos extraños, dispepsia o diarrea). Todos ellos presentaron al momento de la toma de muestra endoscópica, serología negativa para marcadores de EC e histología duodenal normal.



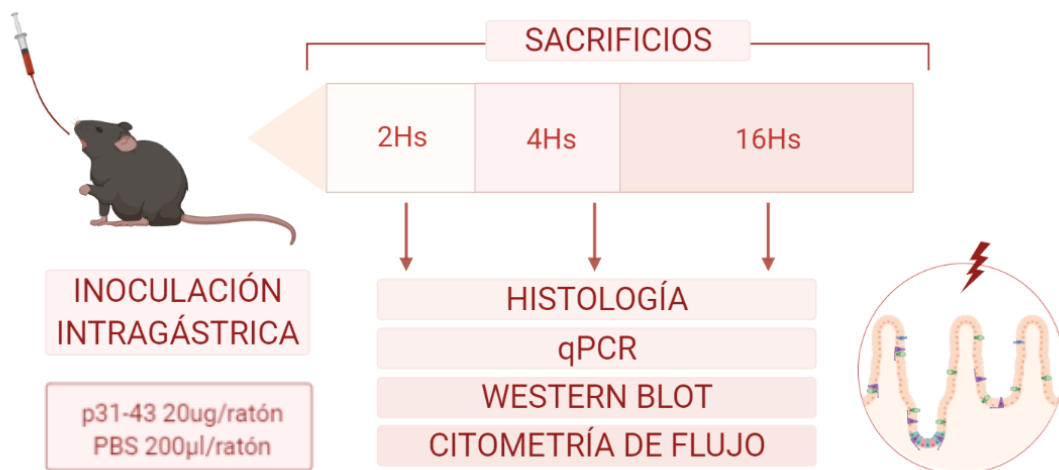
## 2. Obtención de Muestras Murinas

### 2.1 Ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de siete semanas de edad provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos y se les dio acceso a alimentos esterilizados en autoclave y agua a demanda. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices éticas locales y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional La Plata (Protocolo 009-27-17).

### 2.2 Modelo experimental de enteropatía

Por vía intragástrica se administraron 20  $\mu$ g de p31-43 (LGQQQPFPPQQPY), con una pureza > 95% (GeneCust, Luxemburgo) en 200  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS), o 200  $\mu$ l de PBS como vehículo, usando una sonda oral curva (22G, 3,8 cm). Los ratones se sacrificaron 2, 4 o 16hs después de la alimentación por sonda y se tomaron muestras del intestino delgado proximal, 2 cm por debajo del píloro para análisis histológico, qPCR, western blot, citometría de flujo, reacción de TUNEL e inmunofluorescencia indirecta.



#### **Ilustración 8. Diseño experimental de enteropatía por administración de p31-43**

Esquema de diseño experimental para la administración intragástrica del p31-43 o vehículo (PBS) en ratones C57BL/6 y protocolo de toma de muestras.

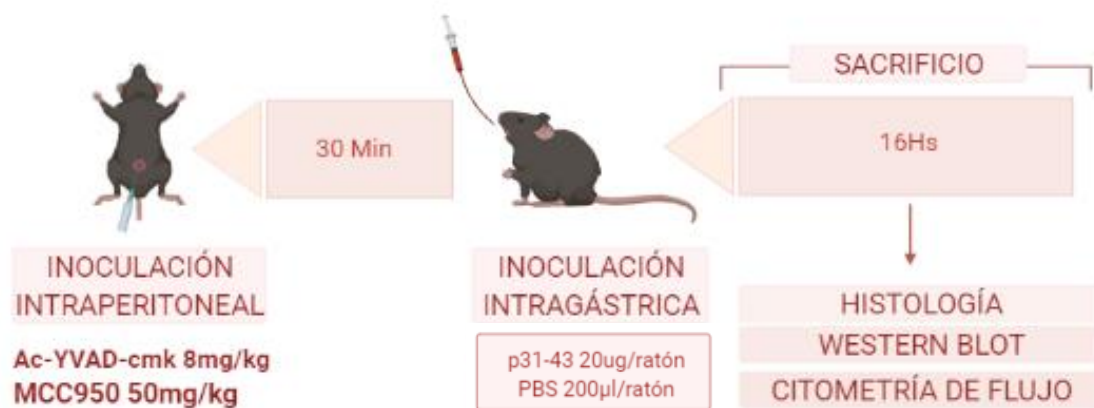
## 2.3 Inhibición farmacológica

### 2.3.1 Inhibición de caspasa-1

Se administró por vía intraperitoneal 8 mg/kg de Ac-YVAD-cmk (InvivoGen, EE.UU.) en DMSO (5% v/v) o vehículo solo (DMSO), 30 min antes de la administración intragástrica de p31-43 o PBS. Se tomaron muestras de intestino delgado proximal 2 cm por debajo del píloro para análisis histológico, western blot y citometría de flujo 16hs post estímulo.

### 2.3.2 Inhibición de NLRP3

Se administró por vía intraperitoneal 50 mg/kg de MCC950 (InvivoGen, EE.UU.) en DMSO o vehículo solo (DMSO), 30 min antes de la administración intragástrica de p31-43 o PBS. Se tomaron muestras de intestino delgado proximal 2 cm por debajo del píloro para análisis histológico, western blot y citometría de flujo 16hs post estímulo.



### Ilustración 9. Diseño experimental de enteropatía por p31-43 e inhibidores

Esquema del diseño experimental para la administración de inhibidores de caspasa-1 o NLRP3 y posterior administración de p31-43 o PBS y protocolo de toma de muestras.

### 2.3.3 Inhibidor de IL-1 $\beta$

Se administró por vía intraperitoneal 10  $\mu$ g/g de anticuerpo inhibidor de IL-1 $\beta$  (BSRU01) o un control de isotipo IgG 2 de ratón, ambos provistos por la Empresa Novartis, una hora antes de la administración intragástrica de p31-43 (20  $\mu$ g de p31-43 en 200  $\mu$ l de PBS) o PBS (200  $\mu$ l). Se tomaron muestras de intestino delgado proximal 2 cm por debajo del píloro para análisis histológico, western blot, qPCR y citometría de flujo 16hs post estímulo.

## 2.4 Aislamiento de epitelio intestinal y *lamina propria* a partir de muestras de intestino delgado de ratón

Segmentos de 10 cm de intestino delgado proximal se lavaron con HBSS (Gibco, Gaithersburg, Md) conteniendo suero fetal bovino (FBS) al 2% v/v, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Los intestinos se cortaron en segmentos de 1 cm y se incubaron durante 30 min a 37°C en una plataforma agitadora en HBSS que contenía 1,4-ditiotreitol 0,1 mM (DTT, Sigma) y ácido etilendiaminotetraacético 0,5 mM (EDTA, Sigma). El material resultante se filtró usando filtros de malla plástica de 80 µm (BD, Bioscience), obteniéndose las células epiteliales intestinales. A continuación, estas células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 200 µl de buffer lisis (Hepes 0,93 M, pH 7,9, EDTA 0,5 M, KCl 1 M, NonidetP40 al 10% v/v) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (Roche, Castle Hill, NSW, Australia) cuando se usa para western blot, o en PBS cuando se usa para citometría de flujo.

Las células de *lamina propria* que habían quedado atrapadas en el filtro se recogieron en 400 µl de buffer lisis suplementado con cóctel inhibidor de proteasas, se disgregaron mecánicamente y se congelaron-descongelaron a -20°C durante 30 min, antes de centrifugarlas a 17000 g durante 30 min y luego analizarlas mediante western blot.

## 3. Análisis de western blot

Las biopsias duodenales de pacientes se congelaron en hielo seco inmediatamente después de su obtención y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su extracción. Las muestras de intestino delgado entero pertenecientes al modelo murino se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido luego de su extracción. Ambos tipos de muestra se resuspendieron en 200 µl de buffer lisis (Hepes 0,93 M, pH 7,9, EDTA 0,5 M, KCl 1 M, Nonidet P40 al 10% v/v), suplementado con 50 µl de cóctel inhibidor de proteasas (Roche, Castle Hill, Nueva Gales del Sur, Australia), se disgregaron mecánicamente mediante el instrumento de dispersión Ultraturax® y se congelaron-descongelaron a -20°C durante 30 min para luego centrifugarlas a 17000 g durante 30 min quedándose con el sobrenadante y se guardaron a -80°C hasta su utilización. El nivel de proteína total se evaluó utilizando el método del ácido bicinconínico kit comercial Micro BCA™ Thermo-Fisher siguiendo las instrucciones del fabricante.

En las muestras de proteína tanto provenientes de biopsias duodenales de pacientes, como de intestino delgado entero de ratón o del aislamiento de epitelio intestinal y *lamina propria*, se desnaturalizaron las proteínas mediante el uso de beta-mercaptotanol, SDS y calor (incubación por 10 min a 100-95°C) y 30 µg/calle se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio en geles al 12,5% con un mini-Protean II Hercules (Bio-Rad, EE. UU.) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (45-004-113, GE Healthcare). Las membranas se bloquearon con leche en polvo descremada al 5% p/v en TBS-T (solución salina tamponada con tris, Tween 20 al 0,1% v/v, pH 8) a 37°C durante 1 hora y se incubaron a 4°C durante la noche con los respectivos

anticuerpos primarios (*ver Tabla II*). Después de lavar con TBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes a 37°C durante 1 hora, y se visualizó utilizando el reactivo quimioluminiscente mejorado (GE Healthcare). Se revelaron y fijaron manualmente con reactivos fotográficos Romek (Gamaxa SRL, Avellaneda, Argentina) según indicaciones del fabricante. Los niveles relativos de la proteína se determinaron utilizando el software ImageJ. En todos los casos, se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

**Tabla II. Anticuerpos utilizados para la técnica de western blot y sus respectivas diluciones**

| Anticuerpos primarios   | Huésped | Dilución | catalogo   | Fabricante        |
|-------------------------|---------|----------|------------|-------------------|
| anti-caspasa-3          | Conejo  | 1/500    | 9662S      | Cell Signaling    |
| anti-caspasa- 8         | Conejo  | 1/700    | NB10056116 | Novus Biologicals |
| anti-caspasa-1          | Ratón   | 1/150    | SC-56036   | Santa Cruz        |
| anti-RIPK3              | Conejo  | 1 /80    | ab56164    | Abcam             |
| anti-GSDMD              | Conejo  | 1/100    | ab225867   | Abcam             |
| anti-GSDMD              | Conejo  | 1/100    | ab210070   | Abcam             |
| anti-IL-1 $\beta$       | Ratón   | 1/100    | P420B      | Invitrogen        |
| anti-pMLKL              | Conejo  | 1/200    | 91689S     | Cell Signaling    |
| anti- $\beta$ -actina   | Conejo  | 1/1500   | ab8227     | Abcam             |
| anti-caspasa-4          | Conejo  | 1/150    | ab25898    | Abcam             |
| Anticuerpos secundarios | Huésped | Dilución | catalogo   | Fabricante        |
| anti-IgG (ratón)-HRP    | Cabra   | 1/2000   | ab6789     | Abcam             |
| anti-IgG (conejo)-HRP   | Cabra   | 1/2000   | 1706515    | BioRad            |

#### **4. Análisis de fluorescencia por microscopía confocal**

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando muestras incluidas en parafina provenientes tanto de biopsias duodenales de pacientes como de intestino delgado de ratones. Las muestras duodenales se fijaron con formol al 4% durante 24hs a temperatura ambiente, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y se incluyeron en parafina en moldes adecuados para su posterior seccionamiento.

Las muestras embebidas en tacos de parafina fueron cortadas en secciones de 5 micrones de espesor y pegadas sobre vidrios positivados mediante la técnica de flotación. Las muestras fueron incubadas en estufa a 65°C durante 45-60 min. A continuación, se extrajo la parafina con 3 pasajes por soluciones de Xilol, y luego se las pasó por un tren de hidratación.

La recuperación antigénica se realizó mediante tratamiento térmico en una solución comercial de citrato de sodio 10 mM (Cat. HK080-9K, Biogenex). Las muestras de tejidos se bloquearon utilizando suero equino al 5% en PBS 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda, y luego se incubaron durante 16hs en cámara húmeda a 4°C con la

dilución del anticuerpo primario o el correspondiente control de isotipo (*ver Tabla III*). Se realizaron lavados con Solución Salina Tampón de Fosfato (PBS) con 0.1% Polisorbato 20 (Tween-20) y se incubó con el anticuerpo secundario adecuado (*ver Tabla III*) durante una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. La tinción nuclear se realizó como paso final, con una solución de Ioduro de Propidio o 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y posteriormente, se realizó el montaje del cubre con una solución de montaje comercial (S3023, Dako Cytomation). Después del montaje, las muestras se visualizaron utilizando un microscopio confocal TCS SP5 (Leica) y las imágenes se analizaron utilizando el software Leica LAS AF.

**Tabla III. Anticuerpos utilizados para estudios por microscopía de fluorescencia y sus respectivas diluciones**

| Anticuerpos primarios      | Huésped | Dilución      | catalogo   | Fabricante        |
|----------------------------|---------|---------------|------------|-------------------|
| anti-caspasa-3             | Conejo  | 1/100         | 9662S      | Cell Signaling    |
| anti-caspasa- 8            | Conejo  | 1/100         | NB10056116 | Novus Biologicals |
| anti-caspasa-1             | Ratón   | 1/100         | SC-56036   | Santa Cruz        |
| anti-RIPK3                 | Conejo  | 1 / 30        | ab56164    | Abcam             |
| anti-GSDMD                 | Conejo  | 1/80          | ab210070   | Abcam             |
| anti-IL-1 $\beta$          | Ratón   | 1/100         | P420B      | Invitrogen        |
| anti-pMLKL                 | Conejo  | 1/100         | 91689S     | Cell Signaling    |
| anti-caspasa-4             |         | 1/50          | ab25898    | Abcam             |
| Controles de isotipo       | Huésped | Dilución      | catalogo   | Fabricante        |
| anti-IgG (ratón)           | -       | Según el 1río | ab91353    | Abcam             |
| anti-IgG (conejo)          | -       | Según el 1río | Ab6702     | Abcam             |
| Anticuerpos secundarios    | Huésped | Dilución      | Catalogo   | Fabricante        |
| anti-IgG (ratón)-Alexa647  | Burro   | 1/600         | ab150107   | Abcam             |
| anti-IgG (conejo)-Alexa647 | Burro   | 1/600         | ab150075   | Abcam             |
| anti-IgG (ratón)-Alexa488  | Cabra   | 1/400         | ab150105   | Abcam             |
| anti-IgG (conejo)-Alexa488 | Cabra   | 1/300         | A11034     | Invitrogen        |

## **5. Reacción de TUNEL**

Las muestras duodenales se fijaron con formol al 4% durante 24hs a temperatura ambiente, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y se incluyeron en parafina en moldes adecuados para su posterior corte en microtomo. Las muestras embebidas en tacos de parafina fueron cortadas en secciones de 5 micrones de espesor y pegadas sobre vidrios positivados mediante la técnica de flotación. Fueron incubadas en estufa a 65°C durante 45-60 min y posteriormente se trataron con el sistema fluorométrico TUNEL DeadEnd™ (G3250, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluyendo tanto un control positivo como uno negativo. Para la tinción nuclear se utilizó DAPI (ThermoFisher, Cat # D3571, RRID: AB\_2307445, EE. UU.) a 1  $\mu$ g / ml. Después del montaje (S3023, Dako Cytomation), las muestras se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia Nikon

Eclipse Ti (fuente de luz: X-Cites Serie 120 Q). Las imágenes se obtuvieron con una cámara Nikon (Nikon Digital Sight DS Ri1), utilizando el software NIS-Elements y las células se contaron utilizando el software ImageJ, calibrando las imágenes para permitir la medición del área en la zona de *lamina propria* donde se realizó la cuantificación de células. Los resultados se expresaron como el número de células TUNEL<sup>+</sup> /  $\mu\text{m}^2$  de *lamina propria*.

Para Identificar las células TUNEL<sup>+</sup> visualizadas se llevó a cabo una marcación combinada. Después de tratar con el sistema Fluorométrico TUNEL DeadEnd™ (G3250, Promega), las muestras se bloquearon utilizando suero equino al 5% en PBS 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda, y luego se incubaron con anticuerpos primarios marcadores de linaje celular (**Ver Tabla IV**). Finalmente, el procedimiento continuó como se explicó en el análisis de microscopía de fluorescencia.

**Tabla IV. Anticuerpos utilizados para comarcación con reacción de TUNEL y sus respectivas diluciones**

| Anticuerpos primarios      | Huésped | Dilución      | catalogo | Fabricante  |
|----------------------------|---------|---------------|----------|-------------|
| anti-CD45                  | Ratón   | 1/50          | SC-1178  | Santa Cruz  |
| anti-CD3                   | Conejo  | 1/50          | A0452    | Dako        |
| anti-CD138                 | Ratón   | 1/30          | M7228    | Dako        |
| anti-CD64                  | Ratón   | 1/50          | SC-1184  | Santa Cruz  |
| anti-CD20                  | Ratón   | 1/50          | 17020942 | Ebioscience |
| anti-CD95                  | Ratón   | 1/50          | BV421    | BD          |
| Controles de isotipo       | Huésped | Dilución      | catalogo | Fabricante  |
| anti-IgG (ratón)           | -       | Según el 1rio | ab91353  | Abcam       |
| anti-IgG (conejo)          | -       | Según el 1rio | Ab6702   | Abcam       |
| Anticuerpos secundarios    | Huésped | Dilución      | catalogo | Fabricante  |
| anti-IgG (ratón)-Alexa647  | Burro   | 1/600         | ab150107 | Abcam       |
| anti-IgG (conejo)-Alexa647 | Burro   | 1/600         | ab150075 | Abcam       |
| anti-IgG (ratón)-Alexa488  | Cabra   | 1/400         | ab150105 | Abcam       |
| anti-IgG (conejo)-Alexa488 | Cabra   | 1/300         | A11034   | Invitrogen  |

## **6. Análisis de expresión genética**

### **6.1 Extracción ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)**

Las biopsias duodenales de pacientes y muestras de intestino delgado de ratones tratados se conservaron en RNAlater (Invitrogen, CA, EE.UU.) a 4°C durante 4hs, se les descartó el conservante y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

La extracción de ARN se realizó empleando el kit comercial IllustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y la muestra se conservó a -80°C hasta su utilización. Su cuantificación y control de calidad se realizó por métodos

espectrofotométricos utilizando un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU). Más tarde se procedió a realizar la reacción de reto-transcripción con el uso del kit: Invitrogen™ M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, EE. UU), siguiendo el protocolo de termociclado recomendado por el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Master cycler gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

## 6.2 Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa para cada uno de los genes de interés se realizó mediante el sistema SYBR Green PCR Super Mix (Invitrogen, cat 11761-100, USA) utilizando un termociclador IQ-Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las secuencias de los cebadores empleados fueron diseñadas u obtenidas de bases de datos comerciales como la Origene® o procedentes de publicaciones libres disponibles en la Web y se detallan en la **Tabla V**.

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 1º ciclo: 10 min a 95ºC; 2º ciclo: 15 seg a 95ºC, 30 seg a 60ºC, 1min a 72ºC; 3º ciclo: Rampa de temperaturas para detección de punto de fusión desde 55ºC a 95ºC. El 2º ciclo se repitió 45-50 veces. El nivel de expresión relativa de los de los genes de interés se calculó utilizando EEF1A1 como gen normalizador.

**Tabla V. Listado de Secuencias de los cebadores utilizados en la técnica de RT-qPCR**

| GEN    | Especie | Secuencia FW            | Secuencia RV             |
|--------|---------|-------------------------|--------------------------|
| EEF1A1 | Humano  | TCGGGCAAGTCCACCAC TAC   | CCAAGACCCAGGCATAC TTGA   |
| IFI16  | Humano  | GATGCCTCCATCAACACCAAGC  | CTGTTGCGTTCAGCACCATCAC   |
| ZBP1   | Humano  | GCAAACCTCCGAAGCCATCCAGA | CCAAGTTGAGGAATCACCTGGTG  |
| NLRP3  | Humano  | GGACTGAAGCACCTGTTGTGCA  | TCCTGAGTCTCCCAAGGCATTC   |
| AIM2   | Humano  | GCTGCACCAAAAGTCTCTCCTC  | CTGCTTGCCTTCTGGGTCTCA    |
| GSDMD  | Humano  | ATGAGGTGCCTCCACAACCTTCC | CCAGTTCCTGGAGATGGTCTC    |
| MLKL   | Humano  | TCACACTTGGAAGCGCATGGT   | GTAGCCTTGAGTTACCAGGAAGT  |
| IL-1B  | Humano  | AATCTGTACCTGTCCTGCGTGTT | TGGGTAATTTTTGGGATCTACTCT |
| HPRT   | Ratón   | GTAAAGCAGTACAGCCCCAAA   | AGGGCATATCCAACAACAACCTT  |
| NLRP3  | Ratón   | AGAGCCTACAGTTGGGTGAAATG | CCACGCCTACCAGGAAATCTC    |
| IL-1B  | Ratón   | GCAACTGTTCTGAACTCAACT   | ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT    |

## 7. Análisis de citometría de flujo

La apoptosis de células epiteliales intestinales (IEC) se evaluó mediante la expresión de Anexina V. Se tiñeron suspensiones celulares de IEC con sonda de viabilidad (LIVE / DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, V34955, Thermo Fisher) o Ioduro de propidio (IP) y EPCAM conjugado con APC (1/400, 563478, BD) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron con buffer binding (Tris-HCl 5mM, pH 8,0, EDTA 0,5mM, NaCl 1M) antes de marcar con Anexina V conjugada con FITC (1/100, 556419, BD) en buffer

binding durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se adquirieron utilizando un FACSAria Fusion (BD Biosciences) y los datos se analizaron con el software FlowJo (Ashland, Oregon). Se utilizaron células no teñidas y células teñidas con un único fluorocromo para establecer la compensación.

## **8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software “Prism 8” de GraphPad (San Diego, Estados Unidos). Cuando las comparaciones se realizaron entre dos poblaciones, se utilizó la prueba *t-Student* para datos no pareados, Mientras que cuando se compararon más de dos poblaciones se utilizó la prueba de ANOVA, post test de Tukey. Los valores de p se detallan en cada gráfico, un  $p < 0,05$  se consideró significativo. Los datos se muestran como medias  $\pm 1$  SEM.

## **9. Ilustraciones**

Para la realización de todas las ilustraciones del presente trabajo de tesis doctoral se utilizó el software de libre acceso BioRender. <https://biorender.com/>



# Capítulo 1: Apoptosis

## Introducción

### 1. Generalidades de la muerte celular por Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que, en condiciones homeostáticas, permite eliminar células dañadas, envejecidas o infectadas (Povea-Cabello et al., 2017). Como no produce daño a la membrana celular, sino que por el contrario la preserva, en esta vía no se libera material intracelular y, por lo tanto, no se induce una respuesta inflamatoria (Bertheloot et al., 2021; Elmore, 2007)

Una célula que muere por apoptosis se caracteriza por presentar pérdida de volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y en etapas finales, formación y liberación de vesículas con membrana intacta, conteniendo restos de organelas, llamados cuerpos apoptóticos (Povea-Cabello et al., 2017), que son endocitados por macrófagos reduciendo así la inducción de inflamación en células y tejidos circundantes (Battistelli & Falcieri, 2020). Dado que éste, es un proceso extremadamente rápido, la observación de cuerpos apoptóticos en los tejidos se limita a condiciones donde existen procesos de muerte masiva (Akers et al., 2013).

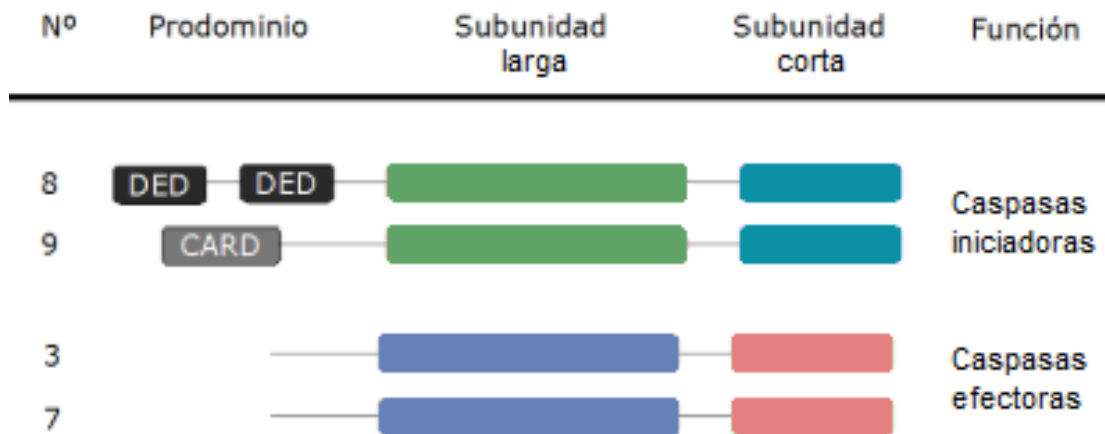
#### **1.1 Moléculas implicadas en la apoptosis**

Antes de explicar los mecanismos propios de esta vía de muerte celular es relevante describir a las caspasas, principales moléculas implicadas, que participan en diversas cascadas de señalización con un papel central en la apoptosis, regulación de la inflamación, proliferación y diferenciación celular.

Las caspasas son cisteín-proteasas que ejercen su función de clivaje proteolítico después de residuos de ácido aspártico, corte que depende de un residuo de cisteína presente en su sitio catalítico (van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Se encuentran como zimógenos (procaspasas), es decir, como precursores enzimáticos inactivos que requieren de clivajes en residuos aspartato para que se exponga su sitio activo y así puedan adquirir actividad catalítica. La estructura de las procaspasas contiene un prodominio N-terminal, que contribuye a su conformación tridimensional, seguido por una subunidad larga y una corta.

Las caspasas son las responsables de la mayoría de los clivajes proteolíticos que ocurren durante la apoptosis y se dividen en “caspasas iniciadoras” de la cascada proteolítica (caspasa-8, -9, entre otras) con prodominios de alrededor de 219 aminoácidos, y “caspasas efectoras” (caspasa-3, -6, -7) con prodominios cortos de alrededor de 23 aminoácidos.

Las caspasas iniciadoras, además, presentan dos regiones de interacción proteína-proteína con una secuencia de aminoácidos altamente conservada: el dominio efector de muerte (DED) que aparentemente está involucrado en la interacción con otras proteínas que señalizan muerte celular, como FADD y TRADD; y el dominio reclutador de caspasas (CARD), importante para la interacción de las caspasas maduras con otras enzimas, además de proteínas adaptadoras y reguladoras (**Ilustración 10**).

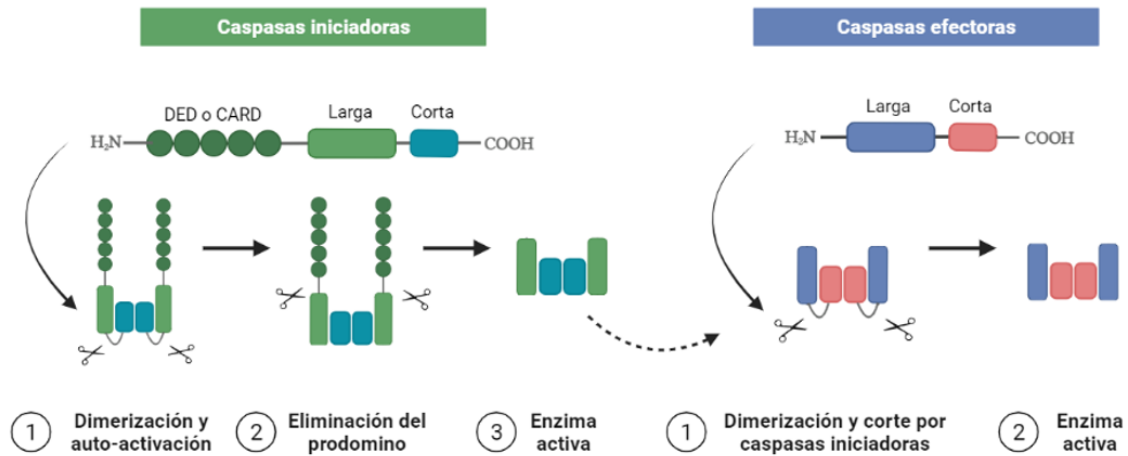


**Ilustración 10. Estructura de las caspasas involucradas en la vía apoptótica**

Entre las caspasas que participan en la apoptosis podemos diferenciar iniciadoras y efectoras. Estas caspasas presentan diferentes especificidades de sustrato y se diferencian según sus prodominios; DED: Dominio efector de muerte, CARD: dominio de reclutamiento de caspasas.

Para que se activen las caspasas efectoras, sus zimógenos deben ser clivados proteolíticamente por las iniciadoras u otras proteasas como Granzima B, mientras que la activación de las iniciadoras se dispara por la dimerización de los zimógenos, a través de una proteína adaptadora, resultando en la formación de un tetrámero compuesto por dos subunidades iguales que se unen en pares adquiriendo la capacidad de auto-procesamiento que conlleva al clivaje de la unión entre la subunidad larga y corta. Los nuevos extremos se pliegan sobre los dímeros, promoviendo cambios conformacionales para crear dos sitios activos con posterior liberación del prodominio.

Tras la activación de las caspasas, pueden ocurrir eventos proteolíticos adicionales sujetos a regulación que provocan una mayor estabilidad de la estructura (Cade & Clark, 2015) (**Ilustración 11**).



**Ilustración 11. Mecanismos de activación de las caspasas**

Las caspasas iniciadoras son monómeros que se activan por dimerización mediada por prodominios adquiriendo la capacidad de auto-procesamiento que conlleva al clivaje de la unión entre la subunidad larga y corta y posterior liberación del prodominio. Las caspasas efectoras son dímeros que se activan por el clivaje de sus subunidades por parte de caspasas iniciadoras u otras proteasas, como Granzima B, originándose la enzima activa.

En este capítulo prestaremos especial atención a las caspasas -8 y -3, elementos principales de la apoptosis. La caspasa-8, es una proteína citosólica de 57 kDa que se sintetiza como una proenzima inactiva. Por ser una caspasa iniciadora de la apoptosis se activa por dimerización dentro de un complejo de receptor de muerte sufriendo un proceso de autoproteólisis para generar un fragmento de 12 kDa y uno de 43 kDa que contiene el sitio activo el cuál ejercerá su función sobre sustratos como Bid o caspasa-3.

Por otro lado, la caspasa-3, es una proteína asociada con la inducción de apoptosis sintetizada como proenzima inactiva de 32 kDa, la cual se procesa por clivaje proteolítico por parte de las caspasas iniciadoras generando dos subunidades de 17 kDa y 15 kDa. Una vez que se activa la caspasa-3, se ponen en marcha una serie de eventos irreversibles que conducen a la muerte de la célula, como la activación de endonucleasas que degradan el ADN dentro del núcleo e inician la condensación de la cromatina, además de la inactivación por clivaje de PARP-1, responsable de la reparación del ADN.

**1.2 Mecanismos de la apoptosis**

La apoptosis puede ser desencadenada por dos mecanismos diferentes: extrínsecos e intrínsecos, los que confluyen en una vía de ejecución común, protagonizada principalmente por la acción de las caspasas. Se ha demostrado además que las dos vías están interconectadas y que las moléculas de una pueden influir en la otra (Elmore, 2007) (Ilustración 12). Se debe tener en cuenta que, aunque existe una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, que pueden desencadenar la apoptosis, por ejemplo, detección de ligandos inductores de muerte, ácidos nucleicos, ROS,

mediadores inflamatorios, toxinas y fármacos, entre otras sustancias (Gordeziani et al., 2017), no todas las células son necesariamente sensibles a los mismos estímulos (Battistelli & Falcieri, 2020).

### **1.2.1 Vía extrínseca de la apoptosis**

La vía apoptótica extrínseca es disparada por señales del medio extracelular, en particular por ligandos de la familia de TNF como TNF- $\alpha$ , FasL y TRAIL, que interactúan con sus receptores TNFR1, TNFRS10A y B, receptor de muerte 3 (DR3) y la proteína de membrana CD95 (también conocida como FAS) en la membrana de la célula blanco. Una vez que se produce la interacción ligando-receptor se gatilla la trimerización de los mismos y se inicia el reclutamiento de moléculas de la vía para formar diferentes complejos multiprotéicos que finalmente regulan la activación de la caspasa-8 (Micheau & Tschopp, 2003).

En el caso de TRAILR1/2, DR3 o Fas se recluta FADD, c-FLIP y procaspasa-8, recibiendo el nombre de complejo DISC ("Death-Inducing Signaling Complex"). Mientras que en el caso de TNFR1 se incluye además a TRADD y TRAF2 recibiendo el nombre de complejo I (Galluzzi et al., 2018).

Estas vías de señalización están reguladas por factores anti-apoptóticos como c-IAP y la variante de corte y empalme de c-FLIP, un inhibidor por competición de la caspasa-8 que presenta un dominio DED a través del cual se une a FADD impidiendo así la unión de la procaspasa-8 al complejo DISC y, por lo tanto, su activación. Además, se ha visto que activa NF- $\kappa$ B, implicado en la supervivencia y proliferación.

A continuación, según el tipo celular, caspasa-8 clivada sigue dos vías. En el caso de las células tipo I (linfocitos), la señal recibida por los receptores es suficiente para que la caspasa-8 generada por esta vía, clive a las procaspasas efectoras -3 y -7. Sin embargo, en las células de tipo II (como los hepatocitos y las células beta pancreáticas), la vía extrínseca se vincula con la mitocondria a través del clivaje por caspasa-8 de la molécula Bid a t-BID, promoviendo la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP), evento que determina finalmente la apoptosis (Galluzzi et al., 2018; Long & Ryan, 2012).

Otra manera de inducir apoptosis es a través de la actividad citotóxica de las células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Este mecanismo implica la activación de receptores de muerte celular programada, como PD-1, que inducen la liberación por parte de las células citotóxicas de gránulos conteniendo Granzima B/ perforina mientras están en contacto con la célula blanco, por ejemplo, células infectadas con virus o células tumorales. La perforina permeabiliza la membrana plasmática de la célula blanco, lo que provoca la entrada de Granzima B al citoplasma, donde puede clivar y activar caspasa-8, 10, 3 y 7 o Bid, induciendo apoptosis (Bertheloot et al., 2021). Por el contrario, Granzima A ejercería su acción a nivel de la mitocondria aumentando la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el daño celular generado podría ser independiente de caspasas. A su vez, Granzima B y también Granzima A, pueden clivar directamente sustratos compartidos con

caspasa-3, como PARP-1 (Ewen et al., 2012; Zhu et al., 2009). PARP-1 es una enzima nuclear involucrada en procesos de reparación del ADN, de gran relevancia para el mantenimiento de la integridad genómica en respuesta al daño, que al ser clivada por caspasa-3 o -7, pierde su función (Chaitanya et al., 2010).

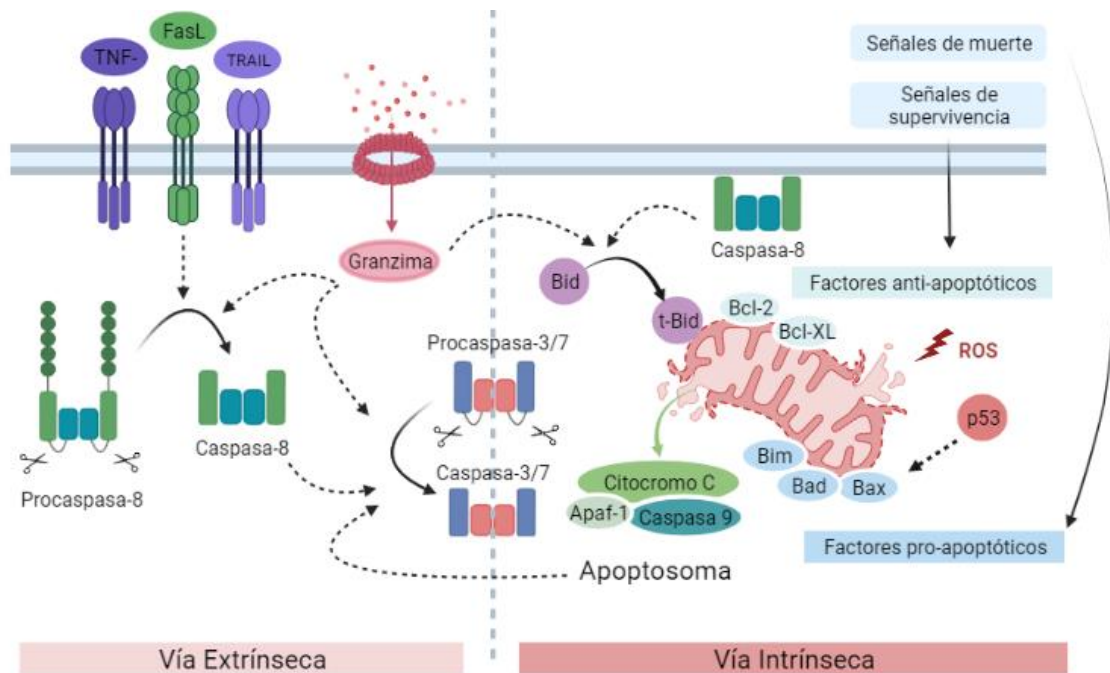
### **1.2.2 Vía intrínseca de la apoptosis**

La vía intrínseca o mitocondrial es sumamente compleja y puede ser disparada por estímulos intracelulares como daño del ADN o estrés oxidativo. Implica la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria debido a la activación de las proteínas formadoras de poros (Bak, Bax). Este poro facilita la liberación del citocromo-c, que se une y activa Apaf-1 y caspasa-9 conformando el apoptosoma, que promueve finalmente la activación de caspasa-3.

La caspasa-3 activa otras procaspasas (caspasa-2, -6, -8 y -10), creando una cascada de amplificación de la apoptosis. A su vez, se liberan factores como Smac y OMI que atenúan la actividad de XIAPs (proteínas inhibidoras de caspasas) promoviendo así la actividad de las caspasas, culminando en la alteración de la membrana nuclear, la escisión de proteínas intracelulares (por ejemplo, PARP), formación de ampollas en la membrana y desestructuración del ADN genómico.

El proceso que lleva a la permeabilización de la membrana mitocondrial es complejo y altamente regulado. Resulta del balance entre proteínas de la familia de Bcl-2 con funciones pro- y anti-apoptóticas. Los factores pro-apoptóticos más relevantes son el dominio BH3, t-Bid, Bim y PUMA, mientras Bad, BIK, BMF, Hrk, NOXA y proteína-1 inducida por PMA, presentarían menor actividad. Estas proteínas interactúan con Bak y Bax promoviendo su acción de permeabilización de la membrana, mientras que los anti-apoptóticos son Bcl-2, BCL-XL, BCL-W, BFL1, MCL1 e inhiben la apoptosis compitiendo con la unión de los miembros de la familia BH3 a Bax y Bak. El equilibrio entre estos dos grupos de factores determina si las células sobrevivirán o seguirán un proceso de muerte por apoptosis (Bertheloot et al., 2021). A su vez, uno de los mediadores centrales de la apoptosis intrínseca es la proteína p53, que se activa tras el daño del ADN inducido por oxidantes, agentes alquilantes o radiación, y promueve la expresión de los factores pro-apoptóticos, mientras induce la disminución de la expresión de Bcl-2. La liberación de AIF y Endonucleasa G desde la mitocondria puede generar, además, apoptosis independiente de caspasas.

Uno de los desencadenantes inmunológicos más potentes de la apoptosis intrínseca es consecuencia de la acción de linfocitos T citotóxicos y las células NK. Estas células liberan gránulos que contienen Granzima B y perforina que, como hemos mencionado, comunica las vías extrínseca e intrínseca (Long & Ryan, 2012).



**Ilustración 12. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis**

Mecanismos extrínsecos e intrínsecos de la apoptosis. En el lado izquierdo se esquematiza la apoptosis extrínseca activada por ligandos de la superfamilia de TNF como FasL que lleva a la activación de la caspasa-8 (iniciadora), y finalmente la efectora, caspasa-3. A su vez las granzimas liberadas por linfocitos T citotóxicos o células NK pueden disparar apoptosis en la célula blanco clivando y activando caspasa-3 directamente o también por la vía mitocondrial clivando Bid. En el lado derecho se esquematiza la vía intrínseca donde la permeabilización de la membrana mitocondrial puede estar disparada por estímulos como ROS y está regulada por proteínas pro- y anti-apoptóticas (Bax/Bad y Bcl-2; respectivamente). Su activación provoca liberación del citocromo c, formación del apoptosoma (cit c, APAF-1, caspasa-9) y activación de caspasa-3.

**2. Apoptosis en el intestino delgado**

Como ya se ha mencionado en la introducción general, las células epiteliales del intestino delgado tienen un rápido recambio, renovándose completamente cada 5-7 días (Potten, 1997). Esto implica una pérdida masiva y constante de células dañadas, con reemplazo continuo por enterocitos recién diferenciados que surgen de células precursoras (stems) localizadas en las criptas.

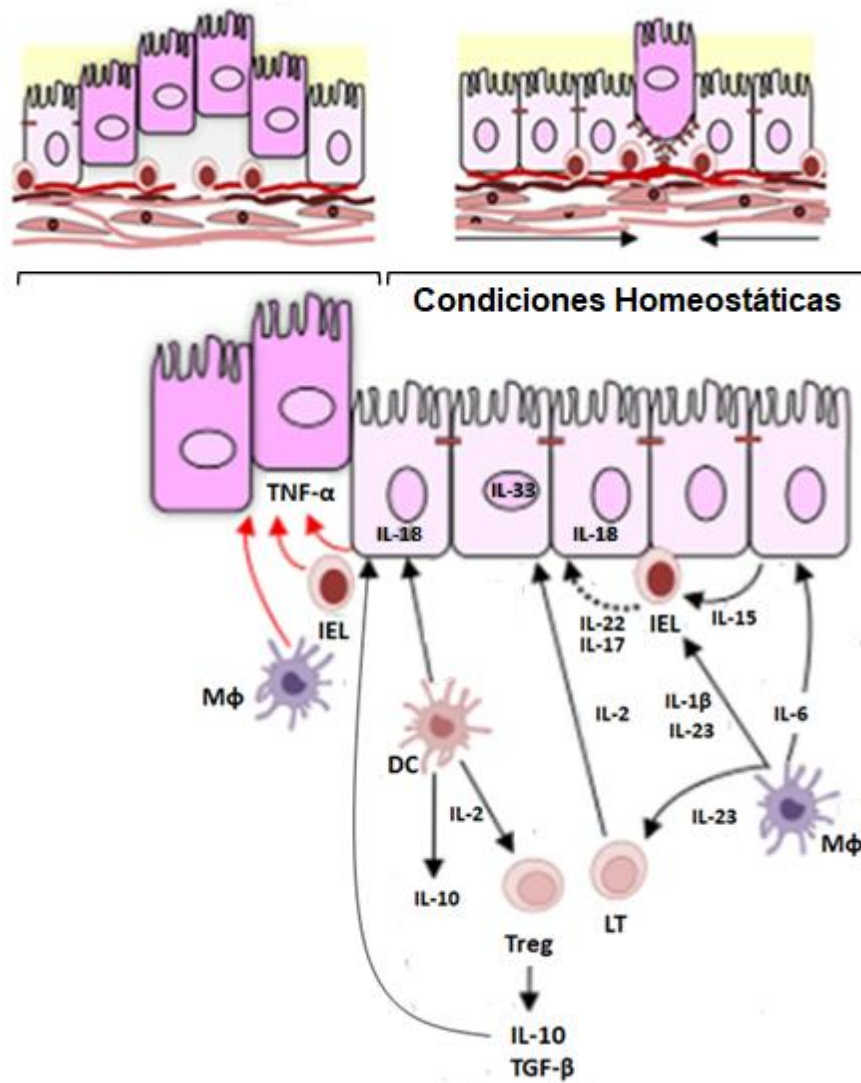
En homeostasis, las células epiteliales migran desde la base de la cripta hasta la punta de las vellosidades. Esto se logra mediante el movimiento de las células epiteliales a través de interacciones epitelio-membrana basal entre integrinas, proteoglicanos de sulfato de heparina y matriz extracelular. Después de migrar hacia las puntas de las vellosidades, se produce el desprendimiento de los enterocitos envejecidos asociado a la redistribución de las proteínas de unión estrecha en un proceso de PCD denominado anoikis (Hall et al., 1994; F. Wang et al., 2011).

En estas condiciones, el citoesqueleto de los enterocitos vecinos se reorganiza rápidamente para completar el espacio generado por la célula extruida y restaurar la integridad de la barrera, sin provocar inflamación (F. Wang et al., 2011; Williams et al., 2015), estos procesos deben controlarse estrictamente en el intestino para mantener la integridad de la barrera epitelial.

Solo unos pocos estudios se centran en la regulación del desprendimiento de células epiteliales. Se ha planteado la posible implicancia de los IELs en este proceso ya que pueden migrar a lo largo del epitelio mediante un mecanismo dependiente de ocludina y dado que esta se redistribuye para rodear las células durante la expulsión, es una hipótesis atractiva que los IELs podrían participar en la regulación a través de mecanismos dependientes de ocludina, iniciando la restitución de células epiteliales al estimular la migración de células hacia el espacio creado por el desprendimiento. También podrían enviar señales a las células epiteliales adyacentes a las células que se desprenden para estimular la reorganización citoesquelética (Edelblum et al., 2012).

En condiciones no homeostáticas, se observa desprendimiento de múltiples células de un solo sitio que conduce a la pérdida de la barrera y posterior exposición a patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), que por medio del reconocimiento de receptores de la inmunidad innata potencia el reclutamiento y la activación de células inmunes inflamatorias (Thoo et al., 2019).

En esas condiciones el TNF- $\alpha$  liberado por IELs, macrófagos y células epiteliales intestinales da como resultado el desprendimiento de células, mientras que se ha demostrado un papel fundamental de las células T regulatorias, las cuales mediante la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  suprimen la respuestas a estas citocinas proinflamatorias. Se ha demostrado además que IL-13 modula las uniones estrechas del epitelio intestinal, la claudina-2 y la apoptosis y, por lo tanto, potencialmente el desprendimiento de células (Patterson & Watson, 2017) (**Ilustración 13**).



**Ilustración 13. Desprendimiento de células epiteliales intestinales**

En condiciones no homeostáticas, el TNF- $\alpha$  es liberado por IELs, macrófagos (M $\phi$ ) y células epiteliales intestinales (representado con flechas rojas), resultando en un desprendimiento desregulado de células. Las vías de las citoquinas secretadas, en condiciones homeostáticas, por las células epiteliales intestinales, los linfocitos T, las células T reguladoras (Tregs) y las células dendríticas (CD) involucradas en la integridad de la barrera epitelial intestinal están representadas por flechas negras. Adaptada de Patterson & Watson, 2017.

**2.1 La apoptosis en enfermedad celiaca**

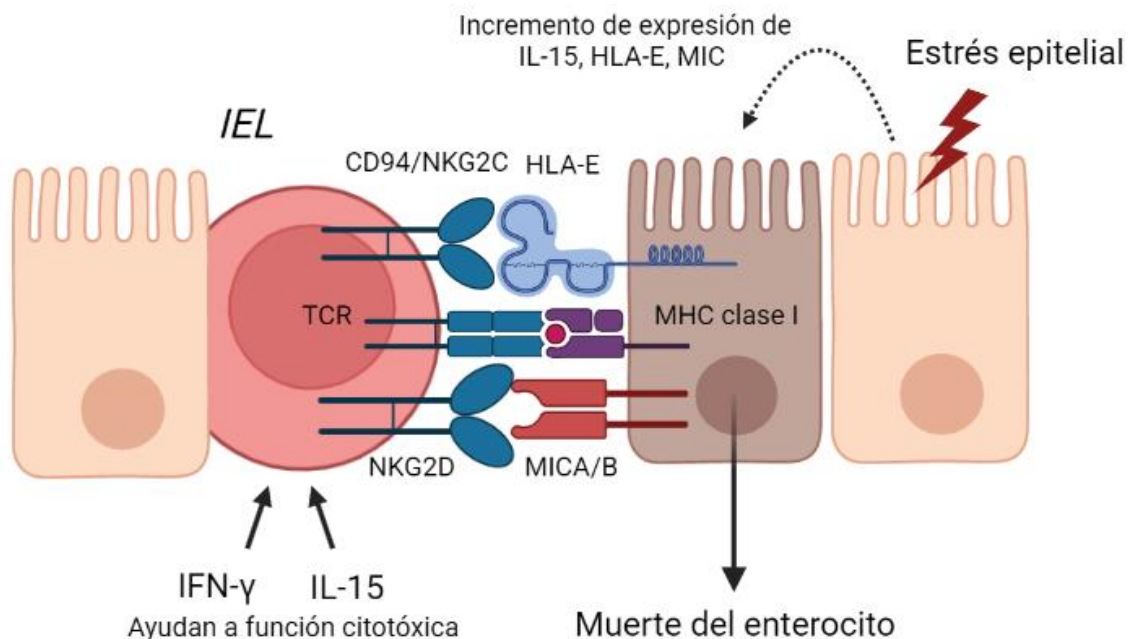
El rasgo histológico característico de EC es la reducción de la altura de las vellosidades en el intestino delgado proximal. Esto es consecuencia de una tasa de muerte de enterocitos incrementada y una pérdida de estructura del tejido por exceso de actividad de enzimas degradativas de la matriz extracelular (metaloproteinasas) (Ciccocioppo et al., 2005). Tradicionalmente, la muerte de enterocitos se ha explicado por una inducción de apoptosis no controlada debido a la sobre-activación de los IELs por la presencia de IFN $\gamma$  e IL-15 (Pietz et al., 2017). Los IELs comprenden una población heterogénea de linfocitos T compuesta



por tres poblaciones mayoritarias de células: linfocitos T  $\text{TCR}\alpha/\beta^+$   $\text{CD8}^+$ , linfocitos T  $\text{TCR}\gamma/\delta^+$  y células NK. Estas células producen  $\text{IFN}\gamma$ , y liberan Granzimas y perforinas (Olaussen et al., 2002).

Además de la inducción de muerte celular por degranulación, el sistema Fas-FasL también participa en la inducción de apoptosis de los enterocitos por IELs (Di Sabatino et al., 2001). Mientras que Fas se expresa constitutivamente en diferentes tejidos y también puede ser inducido por citoquinas proinflamatorias, FasL se expresa principalmente en células T activadas y células NK. En este sentido, se ha demostrado un incremento en la expresión de FasL en linfocitos T, en pacientes celíacos al diagnóstico, y también un aumento en la expresión de Fas en el epitelio (Maiuri et al., 2001).

Además de los mecanismos clásicos mencionados, observaciones tanto de nuestro grupo como de otros, mostraron un mecanismo de muerte de células epiteliales basado en el reconocimiento por el receptor activador (NKG2D), presente en los IELs, de señales de estrés (moléculas de MHC de clase I no clásica, MICA) expresadas en la superficie de los enterocitos (Allegretti et al., 2013). Siendo IL-15 crítica en esta vía, dado que induce la expresión de MICA y potencia la actividad citotóxica de los IELs (James et al., 2021) (Ilustración 14).



**Ilustración 14. Esquema de las señales de muerte de enterocitos por receptores NK de IELs**

En el intestino delgado de los pacientes celíacos, los IELs citotóxicos podrían desencadenar apoptosis directamente al reconocer proteínas de membrana relacionadas con el estrés (MICA, HLA-E) mediante receptores NK específicos (NKG2D, CD94:NKG2C). Los péptidos derivados del gluten y/o el accionar de virus y bacterias activan vías proinflamatorias en el epitelio, e inducen la expresión de IL-15, MICA y HLA-E. El  $\text{IFN}\gamma$  favorece el microambiente proinflamatorio y sensibiliza a los enterocitos ante la acción de IELs citotóxicos. Además, los

*T CD4<sup>+</sup> activados potencian directamente la actividad citotóxica de IELs, probablemente a través de la secreción de IFN $\gamma$  e IL-21 y su acción sinérgica con IL-15. La IL-15 incrementada inhibiría la acción de linfocitos T regulatorios (Treg) favoreciendo la activación de las células Th1. Adaptada de Sollid & Jabri, 2013.*

Otros estudios mostraron que la muerte celular, en especial la apoptosis, está implicada en la patogenia de EC. Se ha demostrado que, en el intestino delgado de pacientes celíacos al diagnóstico, el estrés oxidativo puede inducir apoptosis, así como diferenciación alterada del epitelio, mientras que, por inmunohistoquímica, se encontró expresión aumentada de marcadores de apoptosis como caspasa-3 (Shalimar et al., 2013).

## 2.2 Apoptosis en el modelo de enteropatía

Se ha corroborado en numerosos estudios, a lo largo de los años, que el p31-43 induce apoptosis tanto *in vitro*, como *in vivo* (Chirido et al., 2021).

Existen múltiples evidencias *in vitro* que relacionan a las gliadinas con la muerte celular. Por ejemplo, utilizando una línea epitelial intestinal (Caco-2), se mostró que el tratamiento con una fracción de gliadinas digeridas con pepsina-tripsina (PT-gliadinas) induce apoptosis y que la misma es mediada por la vía de Fas-FasL (Giovannini et al., 2003).

Se ha probado además que *in vitro* el p31-43 induce efectos tóxicos en líneas celulares epiteliales, así como también es capaz de ingresar a la célula, localizarse en vesículas tempranas y demorar su tráfico hacia vesículas tardías (Barone et al., 2014) provocando estrés celular y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Frossi et al., 2017) e induciendo apoptosis con aumento de permeabilidad y modificación de filamentos de actina (Clemente et al., 2003; Iacomino et al., 2013; Maiuri L et al., 2003).

A su vez, ensayos empleando piezas de biopsias duodenales en cultivo mostraron que el tratamiento con péptidos no inmunogénicos como el p31-43, genera una expresión rápida de IL-15 y apoptosis de enterocitos (Maiuri L et al., 2003).

Se propone a los IELs como los principales inductores de muerte celular en los enterocitos y que las gliadinas pueden estar potenciando esa actividad citotóxica, en ese sentido se ha demostrado la inducción de una clara respuesta innata cuando se incuban biopsias provenientes de pacientes con enfermedad celíaca con el péptido.

Como mencionamos anteriormente, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo experimental en ratón donde la administración de una única dosis de p31-43 por vía intraluminal mediante microcirugía, es capaz de inducir una respuesta inflamatoria y daño en la mucosa de intestino delgado proximal, caracterizada por aumento del número de IELs y reducción de la relación V/C (Araya et al., 2016; Gómez Castro et al., 2019). En este modelo, mostramos que el daño se relaciona con aumento del cociente pro-apoptótico Bax/Bcl-2, aumento del número de células TUNEL<sup>+</sup>, y del número de células epiteliales Anexina V<sup>+</sup>/Ioduro de propidio<sup>+</sup> (Araya et al., 2016) sugiriendo que los mecanismos de

muerte celular están activados y que la apoptosis podría explicar en parte la muerte celular en intestino delgado. Este protocolo ha mostrado representar un buen modelo *in vivo* para estudiar los efectos generados por la respuesta innata inducida por péptidos de gliadinas (Ruera et al., 2021). A raíz del refinamiento del modelo, se vuelve interesante profundizar en estos conocimientos ya que los mismos sugieren que los mecanismos de muerte celular están activados y que la apoptosis podría explicar en parte la muerte celular en intestino delgado. A su vez, estos hallazgos podrían correlacionar con lo observado en muestras de pacientes celíacos. Por esta razón, consideramos de gran utilidad el empleo de este modelo animal que posibilita el estudio de los eventos tempranos que ocurren en un entorno inflamatorio, condición que no es posible investigar en el caso de las biopsias duodenales de pacientes celíacos donde el tejido ya se encuentra en un proceso de daño crónico.

Por otro lado, dados los efectos proinflamatorios descritos para p31-43, se estableció su capacidad de generar estrés celular y producción de ROS, la cual se relaciona con un incremento de la vía intrínseca de la apoptosis.

La producción de ROS ocurre durante procesos homeostáticos de metabolismo celular, sin embargo, si esta producción es mayor a la capacidad antioxidante de la célula, se producirá estrés oxidativo. En condiciones inflamatorias, se produce un reclutamiento de células activadas (neutrófilos y macrófagos) que pueden producir “estallido respiratorio” aumentando los niveles de ROS (Monguzzi et al., 2019). En intestino delgado de pacientes con EC activa, se encontraron altos niveles plasmáticos de ROS (Moretti et al., 2018) evidenciando que el estrés oxidativo media múltiples efectos como la apoptosis y diferenciación alterada del epitelio, además de un marcado descenso en los niveles de expresión de enzimas anti-oxidantes y anti-inflamatorias (Rothen et al., 2007).

Los resultados de los ensayos *in vitro* con células epiteliales adherentes (Caco-2) mostraron que la incubación con PT-gliadinas culmina en un incremento del estrés oxidativo (Maiuri L, et al. 2003).

En la misma línea de estas observaciones, estudios previos de nuestro grupo pusieron en evidencia que en la mucosa duodenal de pacientes celíacos no tratados presentan signos de estrés celular, en particular incremento de la expresión de BIP, proteína asociada a estrés de retículo endoplasmático (Allegretti et al., 2013). En nuestro modelo de enteropatía experimental observamos que la expresión de BIP se encuentra incrementada en el citoplasma de células de animales tratados con p31-43, indicando que la sola presencia de p31-43 es capaz de generar respuesta de estrés a tiempos cortos.

## Justificación

Entre las vías de muerte celular programada, la apoptosis es el mecanismo más aceptado como responsable de la muerte celular masiva en el epitelio del intestino delgado proximal de pacientes celíacos. Sin embargo, existe escasa evidencia experimental sobre los mecanismos de muerte celular que operan en estas condiciones inflamatorias persistentes (no infecciosas). Es por ello, que en el presente capítulo nos centraremos en el estudio de la apoptosis en muestras de biopsias duodenales obtenidas mediante endoscopia, comparando los hallazgos con los observados en intestino delgado proximal obtenidos en nuestro modelo experimental de enteropatía.

## Objetivos específicos

- Analizar los eventos de muerte celular en mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca, en particular los mediadores centrales de la vía de la apoptosis.
- Determinar las células que sufren procesos de muerte celular programada en la mucosa duodenal de pacientes celíacos.
- Evaluar si el p31-43 induce apoptosis en el intestino delgado proximal en un modelo experimental de enteropatía.

## Resultados

### **1. Muerte celular en el intestino delgado proximal**

En condiciones fisiológicas, la mucosa intestinal tiene una renovación permanente de su epitelio, pero también muestra enorme plasticidad para la reparación del tejido cuando existen situaciones de daño. En ambos casos, los mecanismos de muerte puestos en juego deben ser controlados y en este sentido, la apoptosis es el mecanismo de elección para lograr la eliminación de un número elevado de células sin provocar inflamación. Si bien se encuentran en bibliografía evidencias de la actividad de elementos de esta vía en mucosa de intestino delgado de pacientes celíacos (Hakim & Abd El-Kareem, 2021; Shalimar et al., 2013), no se encuentran estudios detallados. Por este motivo, en este capítulo, evaluaremos la vía de apoptosis en la mucosa duodenal humana y en intestino delgado proximal en nuestro modelo de enteropatía.

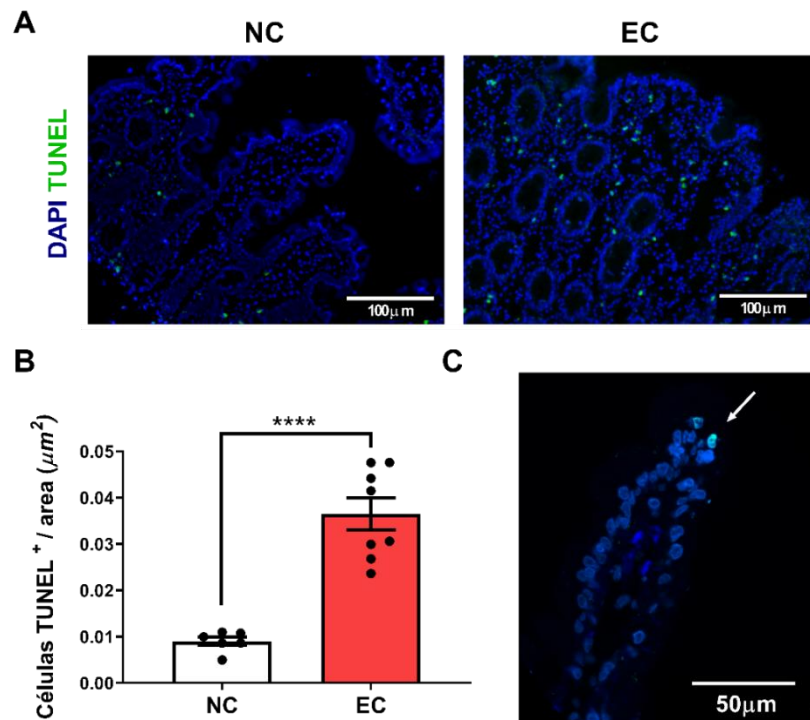
#### **1.1 Análisis de la muerte celular en la mucosa duodenal**

Como hemos mencionado, aunque es conocido que los epitelios, y en especial el epitelio intestinal, tienen una rápida renovación, la información sobre la muerte celular en intestino delgado de pacientes celíacos es muy limitada, por lo que decidimos comenzar nuestro estudio empleando la técnica de TUNEL, que nos permite identificar aquellas células en estadio avanzado de muerte celular.

Con este fin, evaluamos la presencia de células TUNEL<sup>+</sup> en secciones de biopsias duodenales de pacientes celíacos (EC) y población control (NC), tanto adultos como pediátricos. Ambos grupos etarios fueron analizados de manera conjunta, ya que no se observaron diferencias al analizarlos en forma separada (**Figura 1. A-B**).

Encontramos un incremento significativo en el número de células TUNEL<sup>+</sup> en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos en comparación con los pacientes pertenecientes a la población control. Llamativamente, las células TUNEL<sup>+</sup> fueron encontradas en la *lamina propria* y muy ocasionalmente encontramos células TUNEL<sup>+</sup> en el epitelio.

Aunque es aceptado que la muerte celular masiva ocurre en los enterocitos, en nuestros ensayos ha sido difícil encontrar enterocitos TUNEL<sup>+</sup> observándose ocasionalmente en una pequeña proporción de todos los pacientes celíacos analizados (**Figura 1.C**). Dado que la reacción de TUNEL detecta estadios avanzados en la muerte celular, este hallazgo ocasional puede ser consecuencia de la rápida extrusión de los enterocitos muertos en el lumen intestinal en una etapa anterior a la detectable por la reacción de TUNEL.



**Figura 1. Aumento de la muerte celular en la mucosa duodenal de pacientes celíacos**

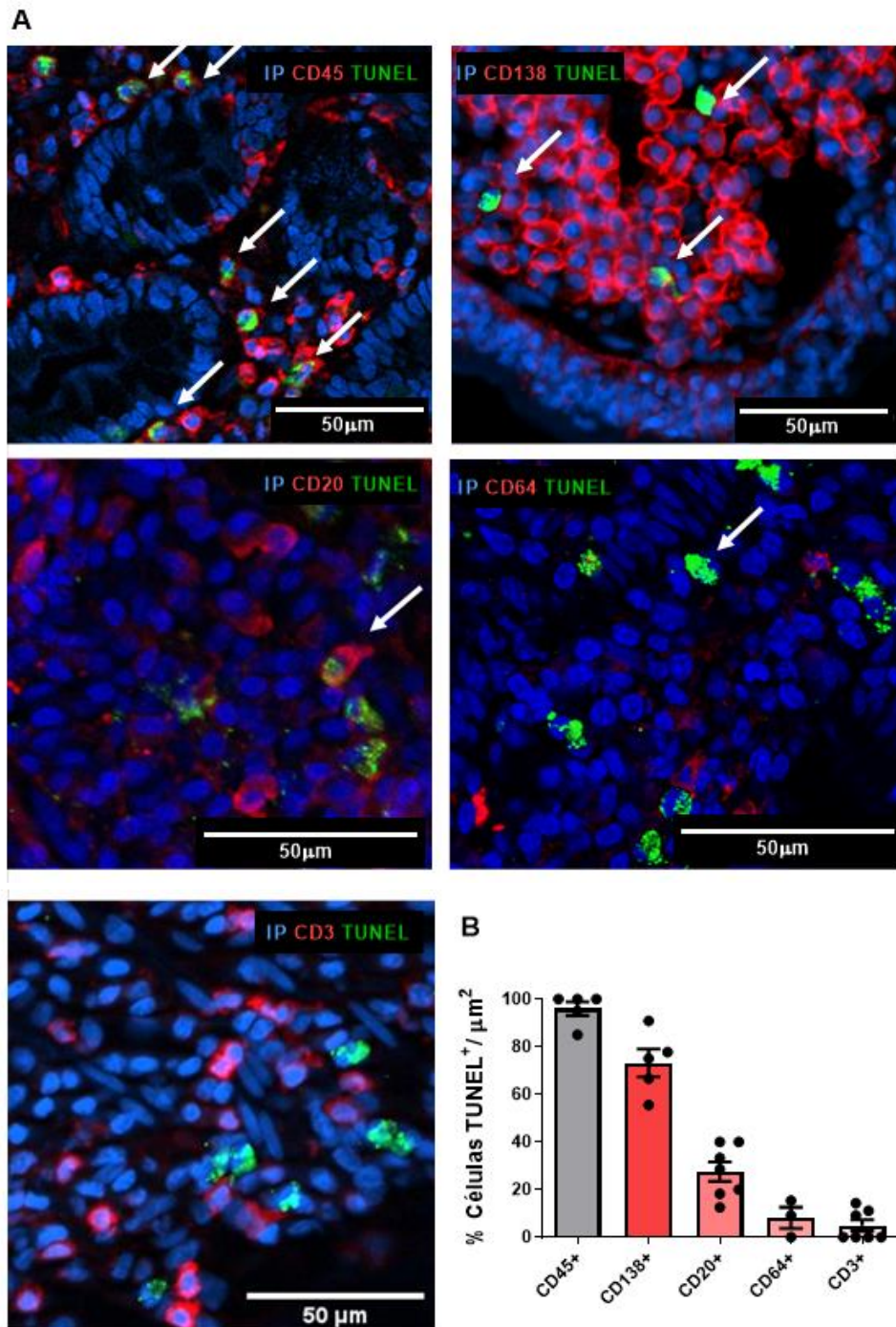
**A.** Imágenes representativas de reacción de TUNEL en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos (EC) y controles (NC). DAPI marca los núcleos (azul) y las células TUNEL<sup>+</sup> se observan en verde. **B.** Recuento de células TUNEL<sup>+</sup> en cortes histológicos de biopsias duodenales. Los datos se expresan como el número de células TUNEL<sup>+</sup> por  $\mu\text{m}^2$  de lamina propia  $\pm 1$  SEM. (NC = 6, EC = 8). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Prueba t-Student para datos no pareados. **C.** Imagen representativa de una célula TUNEL positiva en la punta de la vellosidad.

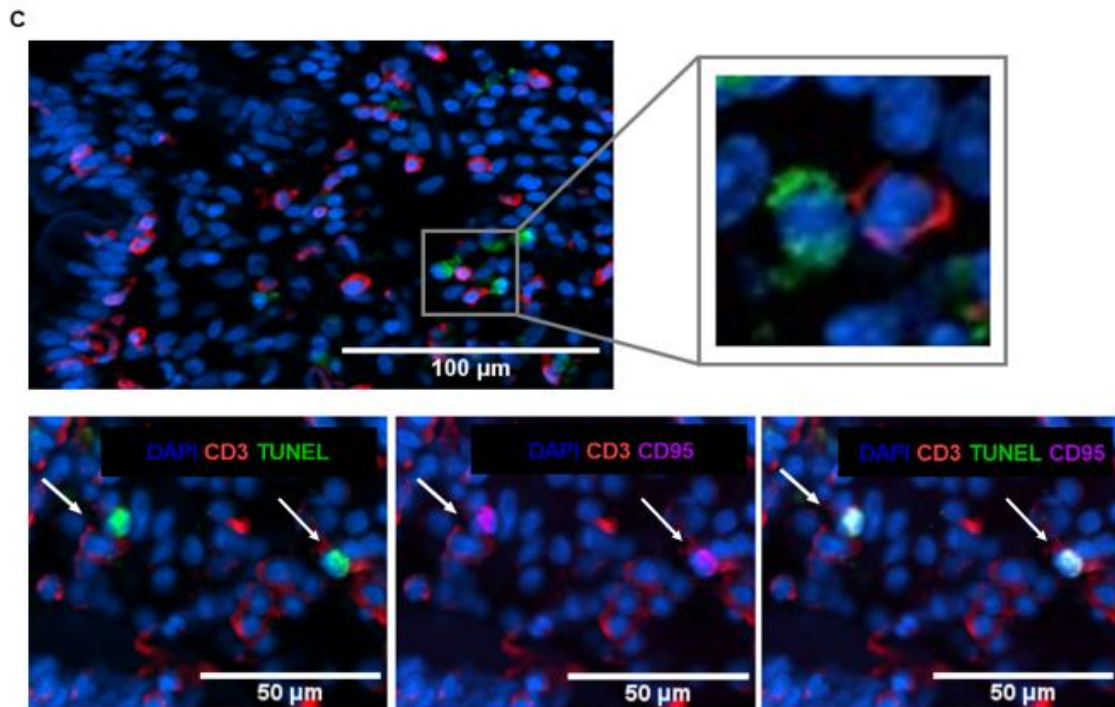
## 1.2 Caracterización de las poblaciones de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propia de pacientes celíacos

Dado el aumento del número de células TUNEL<sup>+</sup> observado en la lamina propia de la mucosa duodenal de pacientes celíacos, nuestro objetivo fue determinar su linaje. Con este fin, realizamos una serie de estudios por inmunofluorescencia indirecta de doble marcación para evidenciar células TUNEL<sup>+</sup> y en forma simultánea, marcadores característicos de células plasmáticas (CD138), macrófagos / neutrófilos (CD64), linfocitos B (CD20), linfocitos T (CD3) y marcador pan-leucocitario (CD45).

Observamos que las células TUNEL<sup>+</sup> expresan en su totalidad CD45, indicando que son células derivadas de la médula ósea y no del estroma, estando distribuidas de la siguiente manera: 73,2% CD138<sup>+</sup>, 27,5% CD20<sup>+</sup>, 8,2% CD64<sup>+</sup> y 4,9% células CD3<sup>+</sup> (Figura 2.A-B). Por lo tanto, mayoritariamente la población de células TUNEL<sup>+</sup> correspondió a células plasmáticas (CD138<sup>+</sup>).

Analizando las imágenes de fluorescencia, observamos que, en forma llamativa, las células TUNEL<sup>+</sup> se encontraban próximas a linfocitos T (CD3<sup>+</sup>). Dado, que se ha descrito que la vía extrínseca de la apoptosis estaría activa en la enteropatía (di Sabatino, et al., 2001; Perez et al., 2021), decidimos estudiar el sistema Fas/FasL. El análisis por microscopía de fluorescencia en los cortes de biopsias duodenales mostró que la mayoría de las células TUNEL<sup>+</sup> expresaban CD95 y tenían un CD3<sup>+</sup> próximo en contacto estrecho (Figura 2.C). Esto sugeriría, al menos en algunas de las células, un efecto citotóxico directo mediado por el eje Fas/FasL.





**Figura 2. Caracterización de poblaciones de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propia de intestino delgado de pacientes celíacos**

**A.** Imágenes representativas de reacción de TUNEL e inmunofluorescencia indirecta de marcadores de linaje, en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos. DAPI marca los núcleos (azul) y las células TUNEL<sup>+</sup> se observan en verde. Marcadores de linaje: CD45, CD138, CD20, CD64, CD3 (se observan en rojo). **B.** Recuento de células doble positivas en lamina propia. Los datos se expresan como % del número de células doble positivas por  $\mu\text{m}^2$  de lamina propia  $\pm 1$  SEM. (CD45 = 5, CD138 = 5, CD20 = 7, CD64 = 3, CD3 = 7). **C.** Imágenes representativas de la marcación para TUNEL, CD3 y CD95 en secciones de biopsias duodenales de pacientes celíacos. Núcleos (azul), células TUNEL<sup>+</sup> (verde), CD3 (rojo) y CD95 (violeta).

### 1.3 Citotoxicidad mediada por Granzima B

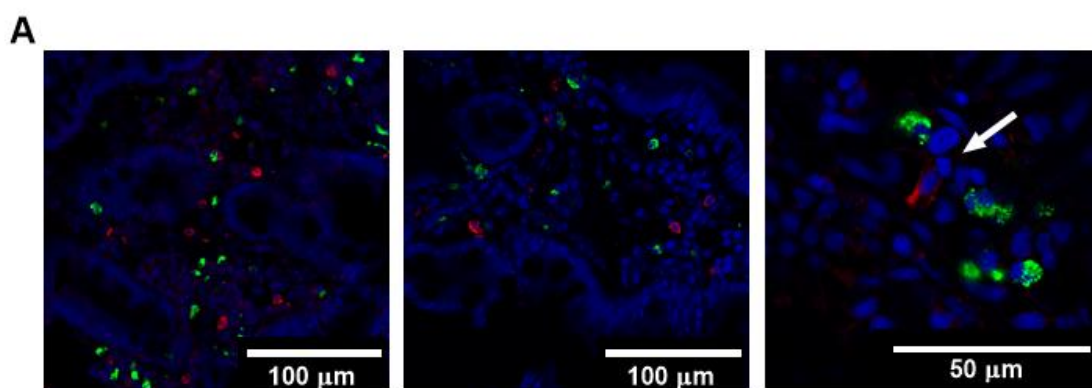
Al momento son pocos los trabajos que han estudiado los mecanismos de daño existentes en la mucosa intestinal durante la EC. Es claro que el número de IELs (linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos T  $\gamma\delta$ , y células NK) está aumentado y serían responsables del incremento de IFN $\gamma$ , Granzimas y perforinas en el compartimiento epitelial, con la consecuente apoptosis de enterocitos. Como mencionamos, algunas Granzimas (serina proteasas presentes en los gránulos de linfocitos T citotóxicos y células NK) son capaces de clivar caspasas en la célula blanco y de esa manera, provocar su muerte por apoptosis.

Debido al gran número de células TUNEL<sup>+</sup> en la lamina propia con células CD3<sup>+</sup> estrechamente relacionadas, decidimos estudiar, además del sistema Fas/FasL, la inducción de muerte a través de Granzima B.



Se han documentado niveles séricos elevados de Granzima B y una mayor expresión en los IELs en el intestino delgado en la EC (Augustin et al., 2005). A su vez, en enterocitos de pacientes celíacos se demostró que la expresión del inhibidor de proteasa 9, encargada de la regulación de la expresión de Granzima B, se encuentra disminuida (Pohjanen et al., 2013).

Se realizó entonces una tinción conjunta de Granzima B con TUNEL, observándose que algunas células TUNEL<sup>+</sup> se encontraban cercanas a células Granzima B<sup>+</sup>, sin embargo, el fenómeno no fue tan frecuente como en el caso del eje Fas/FasL. (Figura 3).



**Figura 3. Estudio de células Granzima B<sup>+</sup> en lamina propia de intestino delgado proximal de pacientes con EC**

A. Imágenes representativas de colocalización de células muertas (TUNEL<sup>+</sup>) y marcación de Granzima B por inmunofluorescencia indirecta en cortes histológicos de intestino delgado proveniente de pacientes con EC. Marcación con DAPI para núcleos (azul). células TUNEL<sup>+</sup> (verde). Células Granzima B<sup>+</sup> (rojas).

## **2. Evaluación de muerte celular por apoptosis en la mucosa duodenal**

### **2.1 Análisis de la expresión de componentes claves de la vía apoptótica en la mucosa duodenal**

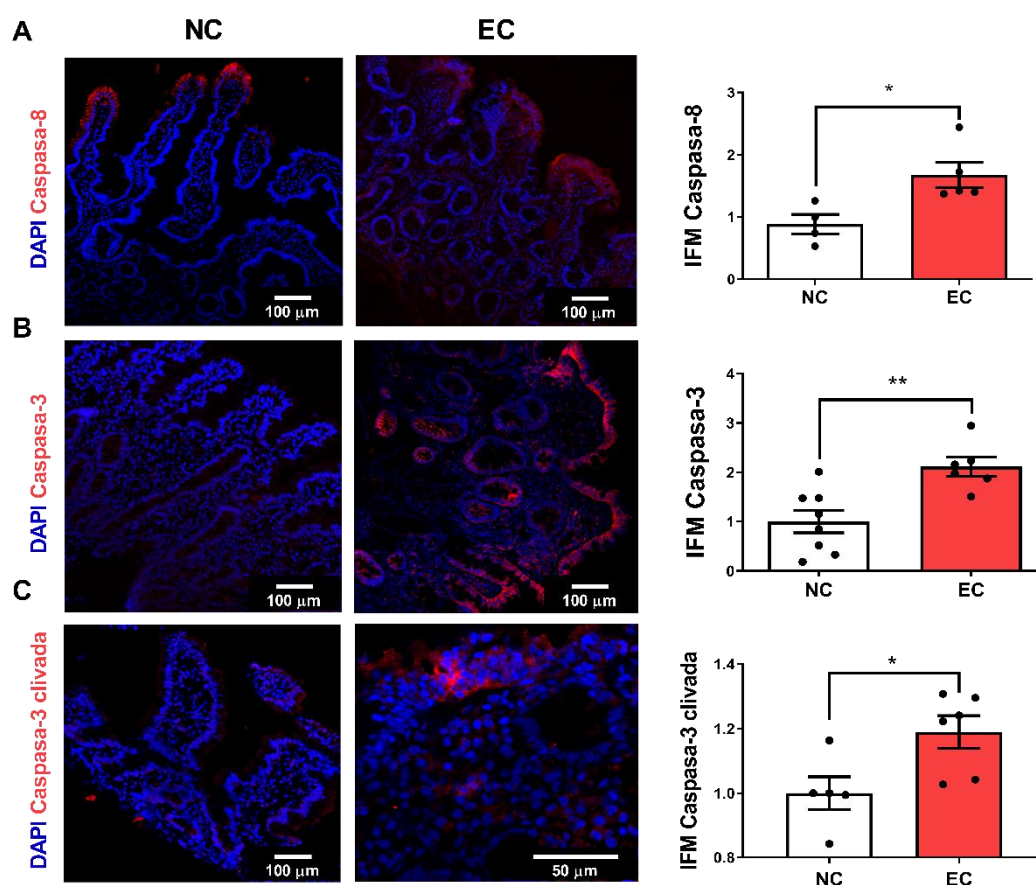
Teniendo en cuenta la elevada tasa de muerte celular observada en la mucosa duodenal de pacientes celíacos, nos propusimos evidenciar si los factores críticos de la vía de la apoptosis se encontraban activados.

Dado que el eje Fas/FasL, vinculado a la vía extrínseca de la apoptosis, ha sido observado en la mucosa duodenal de pacientes celíacos (Cheravsky et al., 2002; Perez et al., 2021; Shalimar et al., 2013) así como en nuestro trabajo, y que hemos observado un alto número de células TUNEL<sup>+</sup>, comenzamos la evaluación de los principales componentes de la vía.

El análisis por inmunofluorescencia indirecta de cortes histológicos de biopsias duodenales mostró un incremento significativo de caspasa-8 y -3 en el caso de pacientes celíacos (EC) en comparación con muestras provenientes de la población no celíaca (NC) (Figura 4.A-B).

Las imágenes obtenidas revelaron que los pacientes celíacos presentan una expresión aumentada de caspasa-8 y -3 tanto en el epitelio como en la *lamina propria*. En unos pocos casos, se observó expresión de caspasa-8 en el epitelio, restringida a la punta de las vellosidades, en duodeno proveniente de la población control (Figura 4.A). Esto puede corresponder al proceso fisiológico propio de la renovación de enterocitos.

Con el fin de determinar la actividad de la vía apoptótica, se realizó la evaluación por inmunofluorescencia indirecta de caspasa-3 clivada. En la Figura 4.C, se observa que en duodeno de pacientes celíacos existe una expresión significativamente incrementada de caspasa-3 clivada, principalmente en el epitelio, confirmando así que estas células se encuentran en proceso de muerte por apoptosis.



**Figura 4. Expresión aumentada de caspasa-8 y -3, en epitelio y lamina propria de duodeno de pacientes celíacos**

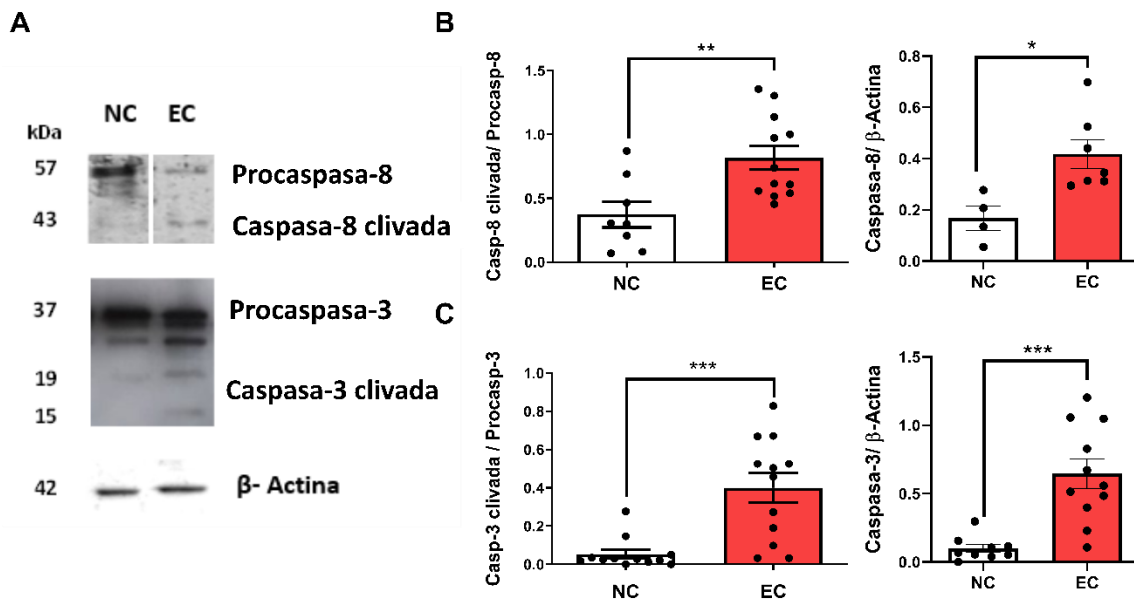
**A. Izquierda:** Imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta de caspasa-8 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos (EC) y de población control (NC). Caspasa-8 (rojo), Núcleos (azul). **Derecha:** Intensidad de fluorescencia media de la marcación de caspasa-8 en secciones de mucosa duodenal. (NC = 4, EC = 5). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **B. Izquierda:** imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta de caspasa-3 en la mucosa duodenal de población EC y NC. Caspasa-3 (rojo), Núcleos (azul). **Derecha:** Intensidad de fluorescencia media de la marcación de caspasa-3 en secciones de mucosa duodenal (NC = 8, EC = 6). \*\*  $p < 0,01$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **C.**

*Izquierda:* Imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta de caspasa-3 clivada en la mucosa duodenal de población EC y NC. Caspasa-3 clivada (rojo), Núcleos (azul). *Derecha:* Intensidad de fluorescencia media de la marcación de caspasa-3 clivada en secciones de mucosa duodenal. (NC = 5, EC = 6). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

Con el objetivo de determinar cuantitativamente las formas activas de caspasa-8 y -3, factores críticos de la apoptosis, se realizaron estudios mediante western blot en extractos de proteínas totales obtenidos de biopsias duodenales.

En la **Figura 5.A-C**, se observa que, en comparación con muestras de la población control, la mucosa duodenal de pacientes celíacos tiene un significativo aumento de las formas clivadas de caspasa-8 y -3 en relación con las proformas. Se destaca también que las formas activas de caspasa-8 y -3 están aumentadas en muestras de la población celíaca cuando se comparan con la proteína de referencia ( $\beta$ -actina), indicando que ambas proteínas aumentaron su expresión, así como también se incrementó su procesamiento y activación.

Estos resultados muestran que la vía de la apoptosis está activa en la mucosa duodenal de pacientes celíacos.



**Figura 5. Niveles aumentados de caspasa-8 y -3 clivadas en muestras duodenales de pacientes con EC activa**

*A.* Imágenes representativas por western blot de fragmentos de caspasa-8 y -3 en pacientes con EC y NC. Se utilizó  $\beta$ -actina como proteína de control de carga. *B. Izquierda:* análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de caspasa-8 clivada: procaspasa-8 en pacientes con EC ( $n = 12$ ) o NC ( $n = 8$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. *Derecha:* Análisis cuantitativo de las expresadas como la proporción de caspasa-8 clivada:  $\beta$ -actina en pacientes con EC y NC. \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para

datos no pareados. **C. Izquierda:** análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de caspasa-3 clivada: procaspasa-3 en pacientes con EC ( $n = 12$ ) o NC ( $n = 12$ ). \*\*\*  $p < 0,001$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **Derecha:** Análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de caspasa-3 clivada:  $\beta$ -actina en pacientes con EC y NC. \*\*\*  $p < 0,001$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

### **3. Evaluación de los mecanismos de muerte celular apoptótica en un modelo murino de enteropatía**

Como hemos mencionado, el modelo experimental de enteropatía desarrollado en nuestro laboratorio, basado en la administración intragástrica del péptido p31-43, evidenció daño histológico en intestino delgado proximal, evaluado como reducción de la relación V/C y aumento del número de IELs.

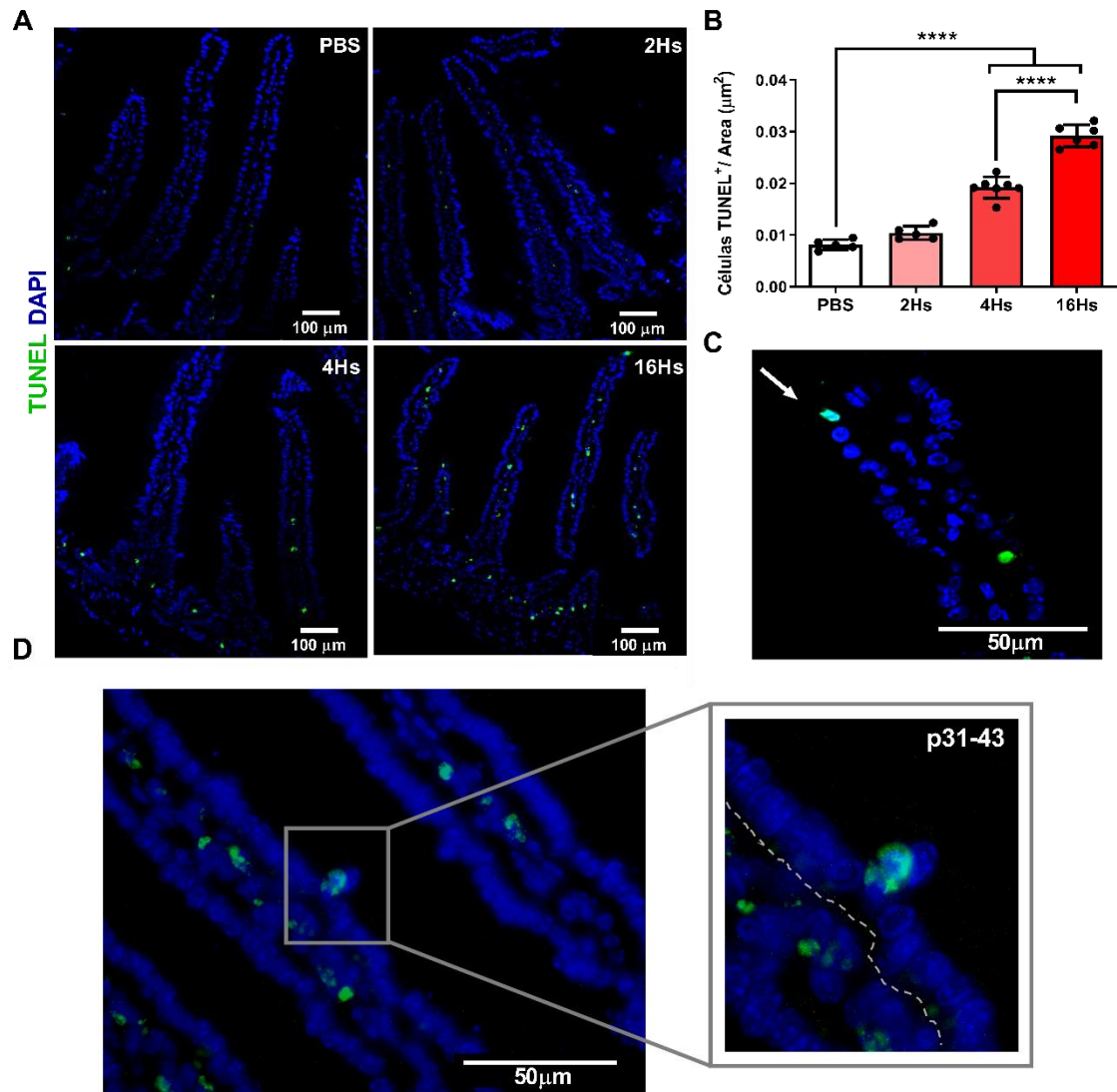
Estas observaciones sugieren que los mecanismos de muerte celular están activos y que la apoptosis podría explicar en parte la muerte celular en intestino delgado. A su vez, estos hallazgos podrían correlacionar con lo observado en muestras de pacientes celíacos. Por esta razón, consideramos de gran utilidad el empleo de este modelo animal que posibilita el estudio de los eventos tempranos que ocurren en un entorno inflamatorio, condición que no es posible investigar en el caso de las biopsias duodenales de pacientes celíacos, donde el tejido ya se encuentra en un proceso de daño crónico.

#### **3.1 Análisis de la muerte celular apoptótica en el intestino delgado proximal de animales tratados con el péptido p31-43**

Con el fin de estudiar el proceso de muerte celular, usamos la reacción de TUNEL para determinar el número de células muertas en el intestino delgado de ratones C57BL/6, 2, 4 y 16hs después de la administración intragástrica de 20  $\mu$ g de p31-43. Se observó un mayor número de células TUNEL<sup>+</sup> en la *lamina propria* de los ratones tratados con p31-43 en comparación con los controles tratados con PBS. Este aumento en la tasa de muerte se observó muy tempranamente, siendo estadísticamente significativo a las 4hs después del tratamiento y aumentando hasta las 16hs post tratamiento (**Figura 6.A-B**).

Al igual que lo observado en las muestras provenientes de pacientes celíacos, solo ocasionalmente, luego de evaluar varias secciones de tejido, se observaron enterocitos TUNEL<sup>+</sup> (**Figura 6.C**). Se documentó, además, en un hallazgo fortuito una célula TUNEL<sup>+</sup> siendo expulsada de la línea de enterocitos en un proceso compatible con anoikis (**Figura 6.D**).

Por tanto, la administración intragástrica de p31-43 induce rápidamente la muerte celular en la *lamina propria* del intestino delgado proximal, con un patrón similar al encontrado en la mucosa duodenal de pacientes celíacos.

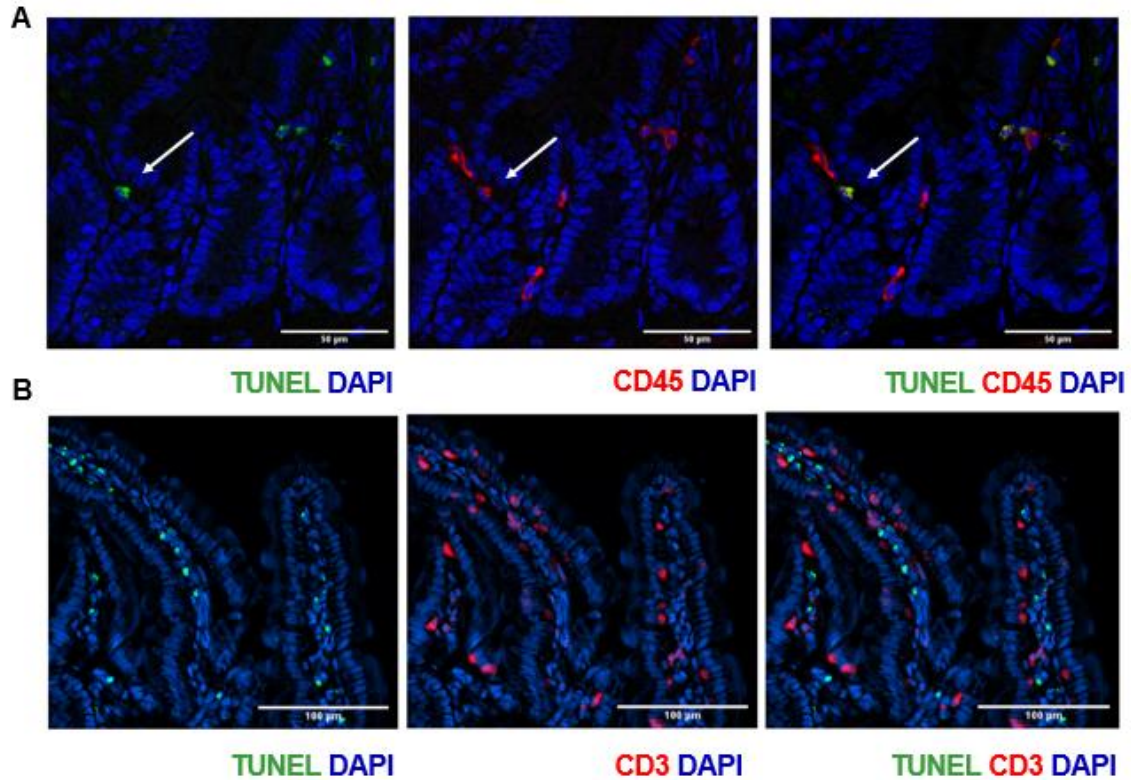


**Figura 6. Aumento de la muerte celular en el intestino delgado proximal de animales tratados con p31-43**

**A.** Imágenes representativas de la marcación de TUNEL en secciones de intestino delgado proximal de ratones C57BL/6, 2, 4 o 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20 µg de gliadina p31-43. Marcación con DAPI para evidenciar núcleos (azul). Células TUNEL<sup>+</sup> (verde). **B.** Recuento de células TUNEL<sup>+</sup> en la lamina propia del intestino delgado de ratones C57BL/6, 2, 4 o 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20 µg de gliadina p31-43. Los datos se expresan como el número de células TUNEL<sup>+</sup> por µm<sup>2</sup> de lamina propia ± 1 SEM. PBS (n = 5), p31-43: 2hs (n = 5), 4hs (n = 7), 16hs (n = 6). \*\*\*\* p <0,0001; ANOVA. **C.** Imagen representativa de una célula TUNEL<sup>+</sup> en la punta de la vellosidad del intestino delgado, 16hs después de la administración intragástrica de p31-43. Marcación con DAPI para núcleos (azul). TUNEL<sup>+</sup> (verde). **D.** Célula TUNEL<sup>+</sup> extruida de la capa epitelial.

Con el fin de conocer los mecanismos de muerte es relevante también identificar las células blanco. Para esto hemos seguido la misma estrategia que en el caso de muestras humanas,

evaluando el linaje de las células TUNEL<sup>+</sup>. En la **Figura 7.A**, se muestra el análisis por microscopía de fluorescencia donde se observa que las células TUNEL<sup>+</sup> pertenecen al compartimento hematopoyético (CD45<sup>+</sup>). En ocasiones se encuentran células CD3<sup>+</sup> ubicadas próximas a las células TUNEL<sup>+</sup> (**Figura 7.B**).



**Figura 7. Caracterización de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propia de intestino delgado proximal de ratones tratados con p31-43**

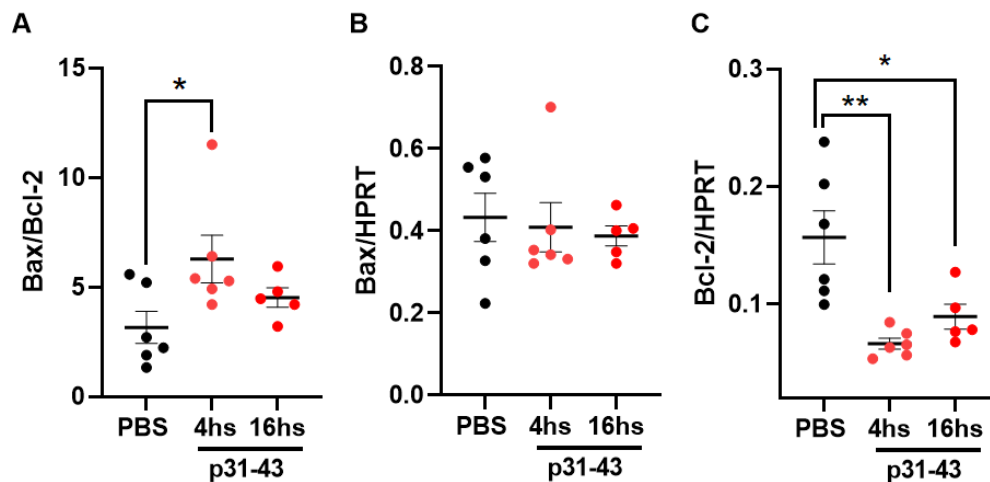
**A.** Imágenes representativas de colocalización de células TUNEL<sup>+</sup> y marcación de CD45 en secciones de intestino delgado proximal de ratones C57BL/6, 16hs después de la administración intragástrica de 20 μg de p31-43. Marcación con DAPI para núcleos (azul). Se muestra el panel del canal verde (TUNEL), canal rojo (CD45) y el solapamiento de ambas adquisiciones. **B.** Imágenes representativas de células TUNEL<sup>+</sup> y marcación de CD3 en secciones de intestino delgado proximal de ratones C57BL/6, 16hs después de la administración intragástrica de 20 μg de p31-43. DAPI (azul), TUNEL<sup>+</sup> (verde), CD3<sup>+</sup> (rojo).

### 3.2 Apoptosis en epitelio y lamina propia de intestino delgado en el modelo experimental de enteropatía

La alteración histológica en la mucosa intestinal observada en la enteropatía causada por la administración intragástrica de p31-43 muestra daño con pérdida estructural del tejido conjuntamente con procesos de remodelamiento, e involucra tanto procesos de muerte celular como de respuesta proliferativa incrementadas (Araya et al., 2016).

Con el fin de caracterizar las vías de muerte, se analizó por PCR cuantitativa la expresión de genes anti- y pro-apoptóticos, Bcl-2 y Bax, respectivamente. Encontramos un incremento en la relación Bax/Bcl2 en intestino delgado de ratones 4hs post-estimulación con p31-43, manteniendo una tendencia no significativa de aumento a las 16hs post tratamiento. Estos hallazgos se relacionan con un perfil pro-apoptótico inducido por la administración de p31-43 (Figura 8).

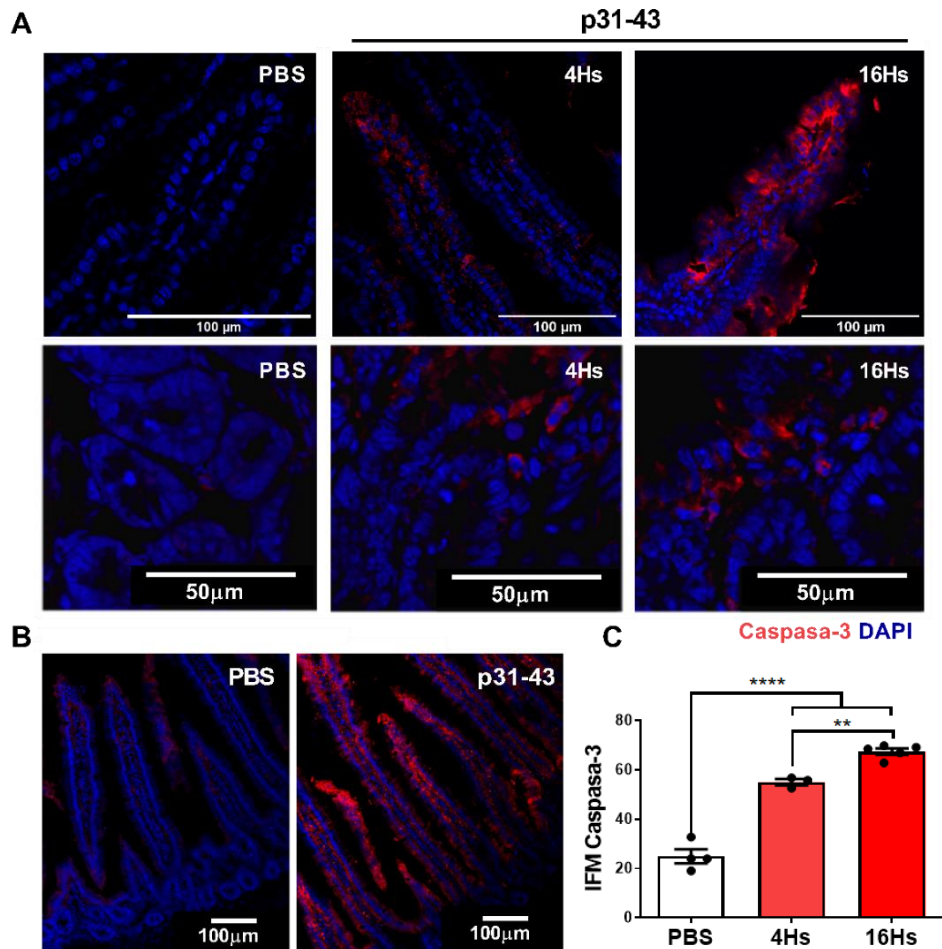
La relación Bax/Bcl-2 aumentada, a expensas de una notable disminución de Bcl-2, sugiere que el p31-43 induce *in vivo* un proceso pro-apoptótico activo y que esto podría ser parte de los mecanismos de daño en la mucosa intestinal llevados a cabo por este péptido.



**Figura 8. Análisis de marcadores involucrados en rutas apoptóticas por PCR cuantitativa** Estudios de expresión a nivel de ARNm de Bax, Bcl-2 por qPCR en extractos de intestino delgado de ratones 4 o 16hs después de la administración de p31-43 o PBS. Niveles referidos a HPRT como gen de referencia. Unidades relativas (UR). Se muestra también la expresión de Bax y Bcl-2 como cociente pro-apoptótico (expresión relativa Bax/Bcl-2). \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; ANOVA.

Dado que en condiciones fisiológicas la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular en el epitelio del intestino delgado (Frisch & Francis, 1994), y habiendo documentado un proceso pro-apoptótico activo evidenciado por el incremento de la relación Bax/Bcl-2, evaluamos la activación de la caspasa-3, como un indicador de la vía intrínseca (dependiente de mitocondrias) y extrínseca (inducida por el receptor de muerte) de la apoptosis.

Por análisis de inmunofluorescencia indirecta en secciones de intestino delgado de animales tratados con p31-43 o vehículo, se detectó la expresión de caspasa-3 en células epiteliales y de la *lamina propria* (Figura 9.A-C). El análisis semicuantitativo de la intensidad de la fluorescencia media mostró un aumento significativo de la expresión de caspasa-3 en secciones del intestino delgado proximal, a las 4 y 16hs después de la administración de p31-43.



**Figura 9. Aumento de la expresión de caspasa-3 en células epiteliales y de la lamina propia de intestino delgado proximal ratones tratados con p31-43**

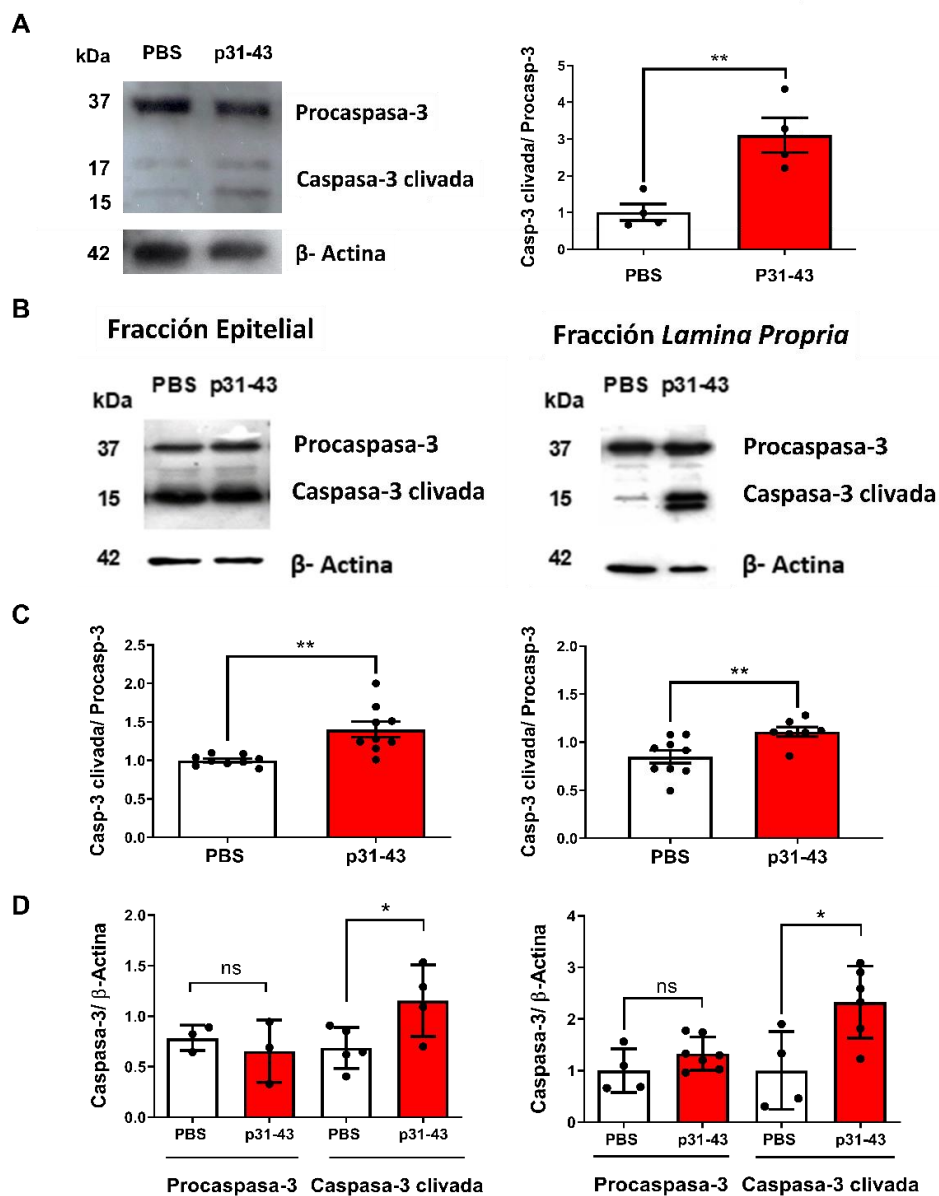
**A.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de la marcación de caspasa-3 en secciones de intestino delgado de ratones C57BL/6, 4 y 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de gliadina p31-43. Región ampliada para evidenciar la marcación de caspasa-3 en epitelio (arriba) y lamina propia. Marcación con DAPI para núcleos (azul), caspasa-3 (rojo). **B.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta de caspasa-3 del intestino delgado de ratones C57BL/6, 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de gliadina p31-43. **C.** Intensidad de fluorescencia media de la expresión de caspasa-3 en las secciones de intestino delgado proximal evaluadas en controles ( $n = 4$ ) o a las 4hs ( $n = 3$ ) y 16hs ( $n = 5$ ) después de la administración de gliadina p31-43. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ ; ANOVA.

Con interés en establecer cuantitativamente la relación entre la caspasa-3 funcional y la forma completa de caspasa-3, se realizaron estudios de extractos de proteínas totales de intestino delgado de ratones tratados por western blot. En la **Figura 10.A**, observamos que, en intestino delgado proximal, el tratamiento con p31-43 por vía intragástrica generó un aumento significativo en la relación caspasa-3/ procaspasa-3 en comparación con los ratones tratados con PBS.



Con el objetivo de obtener más información sobre este proceso, decidimos procesar por separado la fracción epitelial (separada por tratamiento con una solución de 1,4-ditiotreitol 0,1 mM (DTT, Sigma) y ácido etilendiaminotetraacético 0,5 mM (EDTA, Sigma)) y la fracción *lamina propria* (obtenida por digestión enzimática por colagenasa/DNasa del tejido restante).

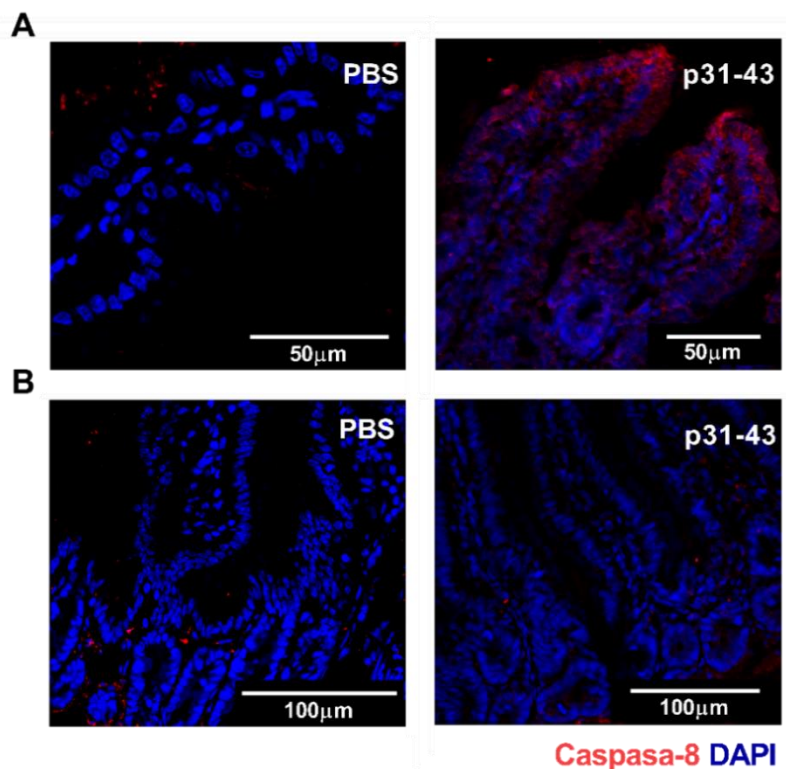
El análisis por western blot mostró un incremento significativo en la relación caspasa-3/procaspasa-3 en ratones 16hs después de la administración de p31-43, comparado con los controles tratados con PBS, tanto en la fracción epitelial como en la obtenida de la *lamina propria* (Figura 10.B-C). Es de destacar que se evidenció un incremento significativo de la activación de caspasa-3 cuando se compara con la proteína de referencia  $\beta$ -actina, tanto en la fracción epitelial como en la de *lamina propria* (Figura 10.D).



**Figura 10. Activación de caspasa-3 en células epiteliales y de la lamina propia de intestino delgado de ratones tratados con gliadina p31-43**

**A. Derecha:** Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de caspasa-3 en extractos proteicos de intestino delgado de ratones 16hs después de la administración de p31-43 o PBS. **Izquierda:** Análisis cuantitativo de las bandas de western blot expresadas como la proporción de caspasa-3 clivada/procaspasa-3 en ratones tratados con p31-43 ( $n = 4$ ) o PBS ( $n = 4$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **B.** Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de caspasa-3 en extractos proteicos de la fracción epitelial o lamina propia del intestino delgado de ratones C57BL/6, 16hs después de la administración intragástrica de PBS o p31-43. **C.** Análisis cuantitativo de las bandas de western blot expresadas como la proporción de caspasa-3 clivada/procaspasa-3, en la fracción epitelial y de lamina propia de intestino delgado, 16 h después de la administración de p31-43 ( $n = 9$ ) o PBS ( $n = 9$ ). \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **D.** Análisis cuantitativo de las bandas de western blot expresadas como la relación de procaspasa-3/ $\beta$ -actina o caspasa-3 clivada/ $\beta$ -actina en la fracción epitelial y de lamina propia de intestino, 16hs después de la administración de p31-43 o PBS. \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

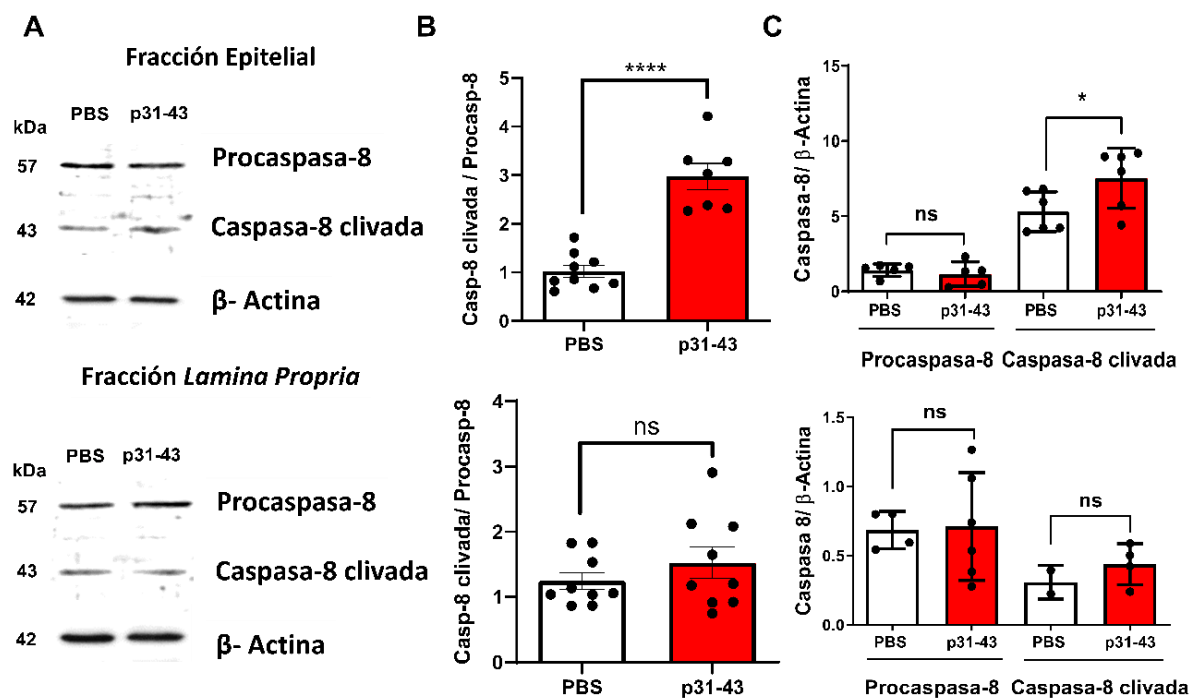
Dado que caspasa-3 es común a ambas vías (extrínseca e intrínseca), decidimos evaluar la expresión de caspasa-8 como indicador de la apoptosis extrínseca. Los estudios de inmunofluorescencia mostraron un aumento de la expresión de caspasa-8 en el epitelio intestinal, en especial en la punta de la vellosidad, pero no en el resto de la mucosa, 16hs después de la administración de p31-43 (**Figura 11**).



**Figura 11. Activación de caspasa-8 en células epiteliales de ratones tratados con gliadina p31-43**

Imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta de la expresión de caspasa-8 de la región epitelial del intestino delgado de ratones C57BL/6, 16hs después de la administración intragástrica de PBS o p31-43. Marcación con DAPI para núcleos (azul), caspasa-8 (rojo). **A.** Punta de las vellosidades. **B.** mucosa.

El análisis mediante western blot también mostró un aumento significativo en la relación caspasa-8/ procaspasa-8 en la fracción epitelial de los ratones tratados con p31-43. En forma concordante con las imágenes de microscopía de fluorescencia no se observaron diferencias significativas en la expresión o clivaje de caspasa-8 en *lamina propria* (Figura 12.A-B). Cuando el análisis se realizó en función del control de carga, demostramos que el incremento de la relación encontrado en la fracción epitelial resultaba ser producto de un aumento de la versión activa de caspasa-8, mientras que los valores de su precursor se mantuvieron en valores comparables tanto en los ratones control como los tratados con p31-43 (Figura 12.C).



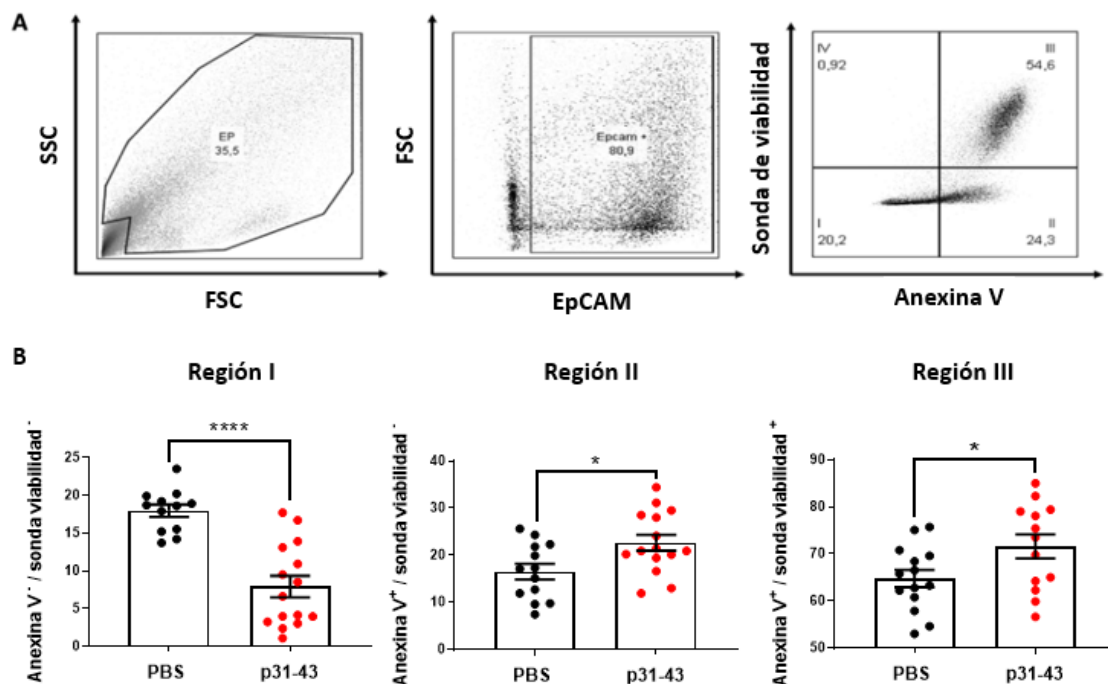
**Figura 12. Aumento de la expresión de caspasa-8 activa en células epiteliales de ratones tratados con gliadina p31-43**

**A.** Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de caspasa-8 en la fracción epitelial o de lamina propia del intestino delgado de ratones C57BL/6, 16hs después de la administración intragástrica de PBS o p31-43. Arriba: Fracción epitelial. Abajo: Fracción lamina propia **B.** Análisis cuantitativo de las bandas de western blot expresadas como la proporción de caspasa-8 clivada/ procaspasa-8 en la fracción epitelial (arriba) y de lamina propia (abajo) de intestino, 16hs después de la administración de p31-43 (n = 9) o PBS (n = 9). \*\*\*\* p <0,0001; Prueba t-Student para datos no pareados. **C.** Análisis

cuantitativo de las bandas de western blot expresadas como la relación de procaspasa-8/ $\beta$ -actina o caspasa-8 clivada/ $\beta$ -actina en la fracción epitelial (arriba) y de lamina propia (abajo) de intestino delgado, 16hs después de la administración de p31-43 o PBS. \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

Estos resultados muestran que el tratamiento con p31-43 induce apoptosis en el intestino delgado, asociada con la activación de caspasa-3 y caspasa-8 en el epitelio, mientras que en la lamina propia solo se pudo evidenciar activación de caspasa-3.

Dado que el epitelio mostró la mayor inducción del proceso de muerte celular, nos interesó evaluar mediante citometría de flujo, la inducción de muerte en células epiteliales (EpCAM<sup>+</sup>) aisladas de intestino delgado proximal de ratones C57BL/6 tratados con p31-43 o PBS. Para ello, las células epiteliales aisladas fueron marcadas con Anexina V y una sonda de viabilidad. La administración intragástrica de p31-43 indujo, luego de 16hs, un aumento significativo del porcentaje de células epiteliales doble positivas (Anexina V<sup>+</sup>/sonda de viabilidad<sup>+</sup>), que se corresponden con etapas tardías del proceso de muerte celular. También indujo un incremento del porcentaje de células epiteliales Anexina V<sup>+</sup>/sonda de viabilidad<sup>-</sup>, que representa etapas tempranas del proceso de muerte celular. Claramente la proporción de células viables (Anexina V<sup>-</sup>/sonda de viabilidad<sup>-</sup>), fue significativamente menor en los animales tratados con p31-43 (Figura.13).



**Figura 13. Aumento de la muerte celular en el epitelio intestinal por administración de p31-43**

Análisis por citometría de flujo de la fracción epitelial de secciones del intestino delgado de ratones C57BL/6, 16hs después de la administración intragástrica de PBS o p31-43. Las células epiteliales se identificaron como células EpCAM<sup>+</sup>. **A.** Se describe la estrategia de gating. **B.** Porcentajes de células vivas (Anexina V<sup>-</sup> / sonda de viabilidad<sup>-</sup>) (región I), etapas

tempranas en el proceso de muerte (Anexina V<sup>+</sup> / sonda de viabilidad<sup>+</sup>) (región II), células muertas (Anexina V<sup>+</sup> / sonda de viabilidad<sup>+</sup>) (región III) de la población de células EPCAM<sup>+</sup> en ratones que recibieron PBS o p31-43. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

## Discusión

Como hemos mencionado anteriormente en la patogenia de la EC, por reestructuración de la mucosa, se produce pérdida de vellosidades y muerte de enterocitos proponiéndose a la apoptosis exacerbada como principal responsable del proceso (Shalimar et al., 2013). En este sentido, hemos observado un número significativamente elevado de células TUNEL<sup>+</sup> en la mucosa duodenal de pacientes celíacos. Sin embargo, solo ocasionalmente detectamos enterocitos TUNEL<sup>+</sup>. Dado que la técnica de TUNEL detecta etapas tardías de la muerte celular programada, es posible que la extrusión de enterocitos al lumen ocurra en una etapa anterior a la detectable por esta metodología.

Las células epiteliales extruidas mueren por anoikis, desencadenada por la falta de señales de anclaje de las proteínas de la matriz extracelular (Rutering et al., 2015). Este es un proceso extremadamente rápido en el que los enterocitos muertos se extruyen de la capa epitelial en menos de 10 minutos (F. Wang et al., 2011). En el caso de EC, los enterocitos son blanco de citotoxicidad de los IELs y aunque se desconoce la cinética del proceso, es esperable que sea aún más rápido que el fisiológico, (Mayassi et al., 2019; Meresse et al., 2006) y que por esta razón mediante la reacción de TUNEL no podamos evidenciar la muerte celular en la región epitelial de pacientes con enfermedad celíaca.

Semejante a los resultados obtenidos en muestras de biopsias duodenales, encontramos que la administración intragástrica del péptido p31-43 en ratones genera un incremento de células TUNEL<sup>+</sup> en la *lamina propria*. Dicho aumento comienza a etapas tempranas 2-4hs post estímulo continuando hasta las 16hs. Curiosamente, en este modelo animal, obtuvimos imágenes que evidencian el fenómeno de anoikis epitelial. Esto refuerza la idea que los enterocitos se extruyen al lumen mucho antes de las etapas detectables por la técnica.

Para poner en evidencia la muerte de enterocitos en el caso del modelo murino, se empleó citometría de flujo de células epiteliales aisladas de intestino delgado de ratón. En este caso, observamos una disminución significativa de células vivas acompañada de un aumento de células en diferentes estadios de muerte en los ratones tratados con p31-43. A pesar de extremar los cuidados al momento del aislamiento de las células epiteliales para el desarrollo de la técnica, no podemos obviar el hecho de que la muerte celular de enterocitos es disparada inmediatamente después de la resección del tejido debido a la pérdida de anclaje durante el aislamiento (Grossmann et al., 1998). En ese sentido, hemos documentado un elevado basal de células muertas, sin embargo, concluimos que la muerte celular debida al aislamiento de las células epiteliales afecta a todos los lotes por igual, volviéndose estos resultados comparables.

Por otro lado, fue llamativa la gran cantidad de células en la *lamina propria* de pacientes celíacos que sufren un proceso de muerte celular, evidenciado con una reacción de TUNEL positiva. Al ser un hecho que no ha sido explorado en la patología, nos propusimos entonces, identificar el linaje de estas células por medio de estudios de microscopía de fluorescencia indirecta.

Observamos que gran parte de las células TUNEL<sup>+</sup> expresaban CD138, correspondiendo a células plasmáticas. Si tenemos en cuenta que, en condiciones normales en la mucosa intestinal, las células plasmáticas son abundantes (X. Wang et al., 2019) y que se ha demostrado que al igual que en otras patologías intestinales, como lo es la enfermedad inflamatoria intestinal, el recuento de células plasmáticas se incrementa notablemente en comparación con pacientes sanos (Jinno et al., 2006; Scott et al., 1984; Tarlton et al., 2012), podemos suponer que el elevado número de células TUNEL<sup>+</sup> se debe a que estas células siguen un camino de diferenciación normal, aunque por su elevada proporción parecería ser un proceso más relevante. Aunque no tenemos herramientas para profundizar en este fenómeno, nos resultó muy llamativo que próximos a estas células se encontraron linfocitos T CD3<sup>+</sup>, que podrían estar ejerciendo una acción citotóxica, sobre las células CD138<sup>+</sup>, mecanismo que hasta el presente no ha sido evaluado.

Dado que esta es una observación novedosa, y que los únicos estudios disponibles hasta la fecha se centran en la evaluación de la citotoxicidad por parte de los IELs en la región epitelial (Mayassi et al., 2019; Zorro et al., 2020), los próximos estudios se destinaron a confirmar la actividad citotóxica de células en la *lamina propria* así como en determinar cuál es el mecanismo de citotoxicidad.

Diversos trabajos han documentado la existencia e importancia de linfocitos citotóxicos restringidos a HLA clase I A (A\*0101 B\*0801) específicos de gliadina en la *lamina propria* de pacientes celíacos (Picascia et al., 2017). Estas células son capaces de inducir apoptosis en células intestinales en modelos *in vitro* (Abadie et al., 2020). De todos modos, ha sido difícil demostrar mecanismos de citotoxicidad y muerte celular que involucre a los linfocitos T específicos contra péptidos de gluten. En cambio, si se ha observado que el sistema de receptores NK tiene un rol en los mecanismos de citotoxicidad en la mucosa intestinal (Mayassi et al., 2019).

Además, en la EC, se ha encontrado que un aumento de los enterocitos apoptóticos correlaciona con una mayor actividad citotóxica de los IELs, que puede asociarse con niveles más altos de IFN de tipo I (Jarry et al., 2017).

Con el fin de evaluar si la proximidad de los linfocitos T era simple coincidencia, dada la abundancia de células plasmáticas en la mucosa duodenal, o consecuencia de la actividad citotóxica, analizamos la expresión de CD95 (Fas). La inducción de muerte celular por contacto célula citotóxica/ célula blanco mediado por Fas ya había sido propuesto como uno de los ejes citotóxicos en EC (Di Sabatino, et al., 2001). Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia indirecta mostraron la expresión de CD95 en las células

TUNEL<sup>+</sup> que poseían un linfocito CD3<sup>+</sup> cercano, sugiriendo que la apoptosis podía ser, en parte, inducida en las células plasmáticas. Sin embargo, debido a la limitación técnica en el número de canales (colores) que pueden ser adquiridos en el equipo de microscopía confocal de fluorescencia disponible, no pudimos establecer en forma inequívoca la inducción de muerte por el eje Fas/FasL, ya que hubiéramos requerido adquirir cinco marcas en simultáneo (CD138, CD3, CD95, CD95L, TUNEL).

Previamente mencionamos que el daño directo al enterocito por parte de IELs podría estar mediado por el sistema Fas/FasL, pero también por la acción de granzimas y perforinas, (Ciccocioppo et al., 2001). Adentrándonos en el análisis observamos que escasas veces se encuentran células TUNEL<sup>+</sup> cercanas a células Granzima B<sup>+</sup>, sugiriendo que este mecanismo no sería uno de los más relevantes en la *lamina propria*.

Como hemos mencionado, la muerte de los enterocitos es consecuencia de la actividad citotóxica de los IELs, potenciada por el aumento de IL-15, IFNs tipo I e IFN $\gamma$ , granzimas y perforinas. Existen varias investigaciones que muestran la implicancia de factores pro-apoptóticos asociados con la EC. En particular, se encontraron aumentadas las proteínas CD95 y CD95L en intestino de pacientes celíacos (Ciccocioppo et al., 2001). A su vez, la presencia de IFN tipo I e IFN $\gamma$  puede desempeñar un papel en la sensibilización de las células a la vía apoptótica extrínseca al aumentar la expresión de receptores de muerte en diferentes células (TNFR1, DR4, CD95), así como aumentar algunos de los ligandos (TNF- $\alpha$ , CD95, TRAIL). En este sentido, hemos demostrado que la vía de la apoptosis extrínseca está activada en pacientes celíacos, evidenciada por el incremento de las formas bioactivas de caspasa-8 y -3. Asimismo, pudimos verificar en individuos de la población control, que la apoptosis participa en el proceso normal de recambio de enterocitos. Es sabido que las áreas superpobladas del epitelio, especialmente las superficies convexas (como las puntas de las vellosidades), son las regiones más activas para el desprendimiento de células por extrusión (Kai, 2021). Esto correlaciona con nuestra observación de un aumento de la expresión de caspasa-8 y -3 en la punta de las vellosidades de la población control.

Por otro lado, se sugiere que la apoptosis intrínseca puede tener lugar en la EC debido a los hallazgos de expresión disminuida de Bcl-2 y expresión aumentada de p53 citoplasmático en las criptas de tejido duodenal de pacientes con EC no tratados (Shalimar et al., 2013). En este contexto, el incremento de caspasa-3 puede deberse además a la activación de la vía intrínseca producto del daño mitocondrial. Sin embargo, a pesar de que estudios previos de nuestro equipo de trabajo demostraron un incremento del estrés del retículo endoplásmico (Allegretti et al., 2013), se requieren estudios adicionales que incluyan marcadores de las diferentes vías de estrés y de daño mitocondrial.

En el caso del modelo murino de enteropatía, pudimos evidenciar el incremento en la relación Bax/Bcl-2 en intestino delgado de ratones 4hs post estimulación con p31-43, relacionándose con un perfil pro-apoptótico inducido por el tratamiento.



Los estudios realizados en el modelo *in vivo* mostraron que el aumento de muerte celular en intestino de ratones tratados con p31-43 se asocia con mayor tasa de apoptosis, de forma similar a lo encontrado en duodeno de los pacientes celíacos. La evaluación por microscopía de fluorescencia reveló un aumento de la expresión de caspasa-3 tanto en el epitelio como en la *lamina propria*, mientras que el western blot mostró un aumento en la proporción de caspasa-3 clivada/procaspasa-3 en ambos compartimentos. En cambio, se observó un patrón de expresión diferente cuando examinamos caspasa-8. Aunque sus niveles en el epitelio aumentaron rápidamente con el tratamiento con p31-43, al igual que la relación caspasa-8 clivada/ procaspasa-8, no encontramos sobre-expresión o activación de caspasa-8 en la *lamina propria*.

En conjunto, estos resultados podrían indicar que la vía extrínseca de la apoptosis está involucrada en la muerte celular en el epitelio inducida por p31-43, mientras que un mecanismo intrínseco de apoptosis dependiente de caspasa-3, pero independiente de caspasa-8, podría ocurrir en la *lamina propria*. Especulamos que podría ocurrir por acción de la Granzima B liberada por células citotóxicas que clivan la caspasa-3 o Bid para iniciar la vía intrínseca de la apoptosis.

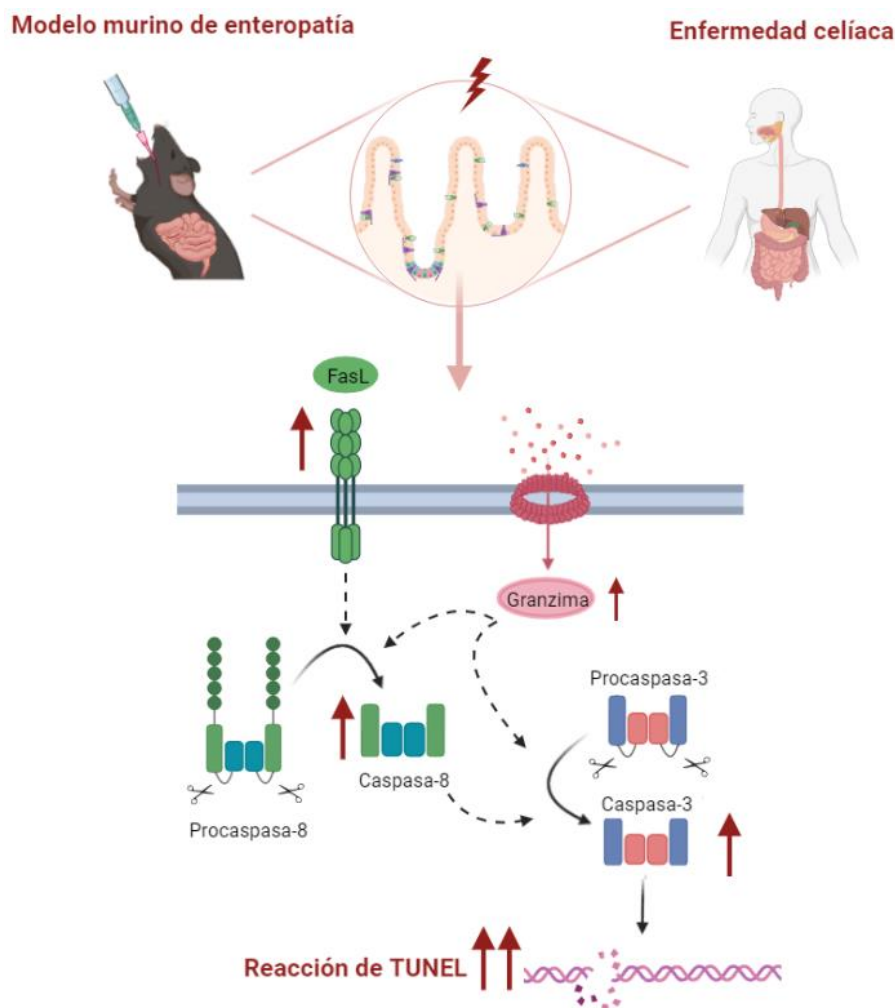
Es importante destacar que la activación de la caspasa-3, precede a las etapas tardías de la muerte celular detectadas por TUNEL. Por esto, la expresión de caspasa-3 se puede detectar en el citoplasma de los enterocitos en las fases muy tempranas del proceso de muerte celular. Sugiriendo que, al igual que sucedía en las muestras provenientes de pacientes celíacos, a pesar de existir un fenómeno activo de muerte celular en el epitelio, la rápida extrusión al lumen de los enterocitos por el fenómeno de anoikis, impide detectar células epiteliales TUNEL<sup>+</sup>.

Un factor importante a tener en cuenta es que, tal como hemos mencionado en la introducción general, los mecanismos que conducen a procesos de muerte celular en nuestro modelo murino de enteropatía provocado por la administración intragástrica de p31-43, no reproducen los mecanismos desencadenados en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos que consumen gluten. En el modelo animal, la muerte celular es solo consecuencia directa del proceso inflamatorio temprano, mientras en los pacientes celíacos se desarrollan mecanismos asociados al proceso crónico de la respuesta adaptativa a la ingesta de péptidos de gluten donde pueden confluir además el rol de células citotóxicas por mecanismos de detección de señales de estrés (MICA) o BTNL8 (Jabri & Abadie, 2015). De esta forma, el recambio epitelial de IELs depende entre otros factores, de señales de estrés local, como la disminución de la expresión de la molécula BTNL8. Este evento, demostrado en los pacientes celíacos, conlleva al incremento irreversible de ciertas poblaciones de IELs de perfil inflamatorio. Sin embargo, queda por determinar cuánto tiempo debe persistir este estado y qué otras señales deben estar presentes para desencadenar el cambio en el perfil de los IELs (Mayassi et al., 2019).

Como comentario final, la **Ilustración 15** resume los resultados obtenidos en este capítulo. En ella podemos observar en paralelo los hallazgos tanto en pacientes con enfermedad

celiaca como en el modelo murino de enteropatía. En ambos casos, se observó un aumento de la actividad de las caspasas -8 y -3 por diversas técnicas, acompañados de un incremento de la señalización a través de la vía Fas/FasL y en menor medida una contribución de la vía de las granzimas. Finalmente, estos mecanismos demuestran un incremento de la apoptosis que se refleja en un aumento de las células TUNEL positivas.

De todas maneras, a partir del gran número de células en proceso de muerte celular observadas en la mucosa, surge una nueva incógnita ¿será la apoptosis la única fuente de muerte celular que opera en el tejido? Interrogante que ampliaremos en los siguientes capítulos.



**Ilustración 15. Resumen de resultados de la vía apoptótica en la EC**

En la ilustración se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos sobre la activación de la vía apoptótica tanto en el modelo de enteropatía aguda como en la patogenia de EC. En ambos casos, se observó un aumento de la actividad de las caspasas-8 y -3 por diversas técnicas, acompañados de un incremento de la señalización a través de la vía Fas/FasL y en menor medida una contribución de la vía de las granzimas. Estos mecanismos demuestran un incremento de la apoptosis que se refleja en un aumento de las células TUNEL positivas.

## Conclusiones

- Evidenciamos un elevado número de células TUNEL<sup>+</sup> en *lamina propria* de la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca, mientras que fueron pocas las ocasiones donde se hallaron enterocitos positivos para esta marca. Hallazgos similares se obtuvieron en el modelo murino de enteropatía, acompañados de un incremento de las células epiteliales Anexina V<sup>+</sup>/sonda de viabilidad<sup>+</sup> en los ratones tratados con el p31-43.
- Las células CD138<sup>+</sup> (células plasmáticas) explicaron la mayoría de las células TUNEL<sup>+</sup> en *lamina propria* y presentaron una estrecha relación con linfocitos CD3<sup>+</sup> acompañada por la presencia del eje Fas/FasL en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos.
- Documentamos la presencia incrementada de las formas activas de caspasa-8 y -3 indicando que la vía extrínseca de apoptosis se encuentra activada en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca y en el modelo murino.

En base a los puntos detallados concluimos que se ha logrado confirmar que la vía de la apoptosis, descrita como vía fundamental de eliminación masiva de células en el epitelio, se encuentra activa tanto en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca como en nuestro modelo murino de enteropatía.

Podemos argumentar que existe evidencia sustancial de un aumento de la apoptosis, cuyos factores involucrados son el aumento en la actividad citotóxica de los linfocitos en el epitelio y la *lamina propria*, con un incremento en la respuesta inflamatoria y en la producción de citoquinas (principalmente IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) que impulsan la expresión de factores pro-apoptóticos.

# Capítulo 2: Piroptosis

## Introducción

### 1. Generalidades de la muerte celular por piroptosis

#### 1.1 Receptores de la inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo, y está caracterizada por su habilidad para reconocer un amplio espectro de microorganismos tales como virus, bacterias y hongos, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés pattern-recognition receptors) (Medzhitov, 2001). Estos se expresan en todos los tipos celulares incluyendo macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y células epiteliales, entre otros, permitiendo una detección temprana de patógenos directamente en el sitio de infección. Los PRRs reconocen motivos microbianos conservados llamados patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, del inglés microorganisms-associated molecular patterns), los cuales pueden ser de diversa naturaleza: glucídicos ( $\beta$ -glucano), proteicos (flagelina) o componentes de la pared celular bacteriana tales como el peptidoglicano o el lipopolisacárico (LPS) entre muchas otras estructuras.

La activación del sistema inmune no se basa solamente en el reconocimiento de MAMPs, sino también en la presencia de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés danger-associated molecular patterns) que son liberados por las células infectadas o dañadas aún sin infección y que, al ser reconocidos, permiten el reclutamiento de células inmunes para controlar la infección o el proceso de daño en curso e iniciar el proceso de reparación del tejido (Amarante-Mendes et al., 2018).

Los PRRs pueden dividirse en tres grupos según su localización. En el primer grupo se encuentran algunos receptores tipo Toll (TLRs, del inglés Toll-like receptors) y los receptores de lectina tipo-C (CLRs, del inglés C-type lectin receptors), los cuales son proteínas transmembrana encontradas en la membrana plasmática. En el segundo, existen otros que se encuentran en vesículas o endosomas como algunos TLRs (TLR3, 7, 8, 9) y finalmente, en tercer lugar, se encuentran los receptores tipo RIG-I (RLRs, del inglés RIG-I-like receptors), los receptores tipo AIM2 (ALRs, del inglés AIM2-like receptors) y los receptores tipo NOD (NLRs, del inglés NOD (nucleotide-binding oligomerization domain -like receptors), que son proteínas solubles que se encuentran en el citoplasma (Takeuchi & Akira, 2010; Walsh et al., 2013). Estas familias difieren en su estructura, pero convergen en cascadas de señalización que dan lugar a la activación de factores proinflamatorios como el factor nuclear kB (NF-kB), la proteína activadora-1 (AP-1) y factores de regulación del interferón tipo 1 (IRFs).

### **1.1.1 Receptores tipo Toll (TLRs)**

Esta familia de receptores se expresa en diversos tipos celulares, incluyendo células mononucleares, endoteliales y epiteliales. Desde el punto de vista de su estructura, los TLRs son glicoproteínas transmembrana de tipo I que se localizan en la superficie celular (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11) o en los endosomas (TLR 3, 7, 8 y 9).

Los TLRs están compuestos por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El extracelular posee un dominio rico en leucinas (LRR, del inglés: leucine-rich repeat domain) que interviene en el reconocimiento de ligandos, y que induce la dimerización del dominio intracelular y la activación de las cascadas de señalización. El dominio intracelular se denomina dominio TIR (del inglés Toll/IL-1 receptor), por ser homólogo al receptor de la IL-1 (IL-1R), y es necesario para la activación de las cascadas de señalización (Medzhitov, 2001). Los ligandos de TLRs incluyen lipoproteínas, lipopéptidos y mananos (TLR2), ARN de doble cadena (ARNdc) (TLR3), LPS (TLR4), ácidos grasos (TLR2 y TLR4), flagelina (TLR5), ARN de cadena sencilla (ARNcs) (TLR7) y ADN rico en motivos CpG (TLR9) (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016).

Después de la unión al ligando, los receptores forman homo- o heterodímeros y reclutan moléculas adaptadoras como MyD88 (del inglés, myeloid differentiation primary response gene 88), utilizada por todos los TLRs excepto TLR3 y TLR4, cuando es endocitado, quienes emplean TRIF (del inglés, TIR-domaincontaining adaptor-inducing interferón  $\beta$ ). Estas moléculas adaptadoras desencadenan la activación de quinasas (complejo IKK, MAPKs) y factores de transcripción como factor nuclear-kB (NF-kB), la proteína activadora-1 (AP-1) y factores reguladores de interferón (IRFs) (Jeong & Lee, 2011; Takeuchi & Akira, 2010). La activación de los TLRs resulta en la producción de péptidos antimicrobianos, genes proinflamatorios, entre los que destacan los que codifican para citoquinas inflamatorias e interleuquinas, como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , quimoquinas, moléculas de adhesión y coestimuladoras, así como también un aumento de expresión de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHCs).

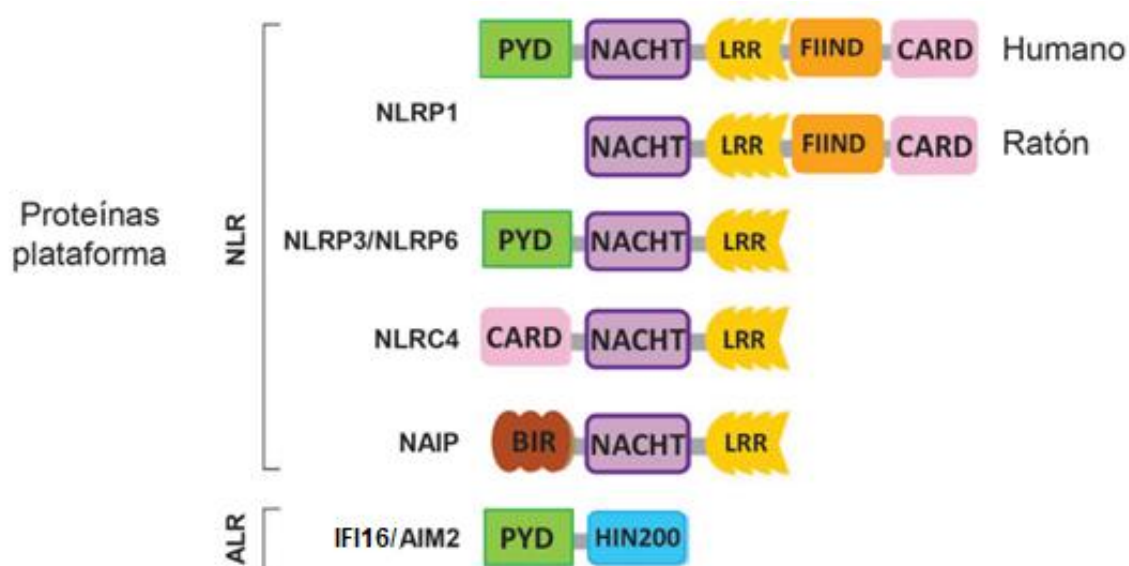
### **1.1.2 Receptores tipo NOD (NLRs)**

Los NLRs son un grupo de proteínas de la inmunidad innata que, al encontrarse solubles en el citoplasma, son capaces de detectar y responder a señales de peligro endógenas o provenientes de microorganismos exógenos, que han invadido el citosol (Kim et al., 2016; Zhong et al., 2013).

Estos receptores, altamente conservados, están formados por tres dominios: un dominio central de unión a nucleótidos llamado NACHT (del inglés, neuronal apoptosis inhibitor protein) que es también conocido como dominio NOD o NBD, un dominio efector N-terminal y un dominio con repeticiones ricas en leucina (LRR) en la región C-terminal, que juega un papel principal en el reconocimiento de los ligandos (Kim et al., 2016).

Existen diferentes NLRs implicados en la inflamación dependiente de caspasa-1 como NOD1, NOD2, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP7 y NLRP12. De estos NLRs, NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 y NLRP7 son capaces de ensamblarse con otras proteínas y formar inflamasomas, desempeñando un rol central en la respuesta inflamatoria (Sutterwala et al., 2007).

Como ya hemos mencionado, existen además otro tipo de receptores no NLR, capaces de desencadenar la activación del inflamasoma dependiente de caspasa-1 como AIM2 e IFI16 (Ilustración 16).



**Ilustración 16. Dominios estructurales de los receptores tipo NOD y ALR**

Los receptores tipo NOD están compuestos por diferentes dominios, cada uno de los cuales contribuye a la función biológica del receptor. Los miembros de la familia NLR poseen un dominio NACHT seguido por varias LRRs, y según el receptor NLR pueden llevar un dominio PYD de unión a ASC (NLRP3 y NLRP6), un dominio CARD de unión a caspasa (NLRC4) o ambos dominios (NLRP1 humana ya que el NLRP1 murino carece del dominio PYD). La proteína AIM2 contiene un dominio PYD seguido de un dominio de unión a ADN, HIN200. Los dominios PYD de AIM2, NLRP1, NLRP3 y NLRP6 reclutan a la proteína adaptadora ASC, mientras que NLRP1 y NLRC4 pueden interactuar directamente con la caspasa-1 a través del dominio CARD o indirectamente a través de ASC. El dominio FIIND encontrado en NLRP1 tiene una función única de activación auto-proteolítica del inflamasoma. Adaptada de Lamkanfi & Dixit, 2012.

## 1.2 El inflamasoma NLRP3

El inflamasoma NLRP3 juega un papel esencial en la inmunidad innata (Watanabe et al., 2021), pertenece a la familia del dominio de unión a nucleótidos (NBD) y proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR) (NLR). Tiene un dominio pirina N-terminal, que interactúa con la proteína adaptadora ASC a través de interacciones entre dominios pirina; un dominio central de adenosina trifosfatasa (ATPasa) conocido como NACHT y un dominio LRR C-terminal (Zhen & Zhang, 2019). ASC también tiene un dominio de reclutamiento de caspasa-1 para promover su dimerización y activación.

NLRP3 es un sensor ampliamente estudiado ya que es activado por un gran espectro de estímulos aparentemente no relacionados que, en distintos modelos, se asocian con el eflujo de  $K^+$  (Xu et al., 2020). La activación inapropiada del inflamasoma NLRP3 está implicada en muchas enfermedades, como tumores, enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Las mutaciones autosómicas dominantes del gen NLRP3 están relacionadas con enfermedades autoinflamatorias que se conocen colectivamente como síndromes periódicos asociados a criopirina (CAPS) (G. Liu et al., 2020).

El ensamblaje del inflamasoma NLRP3 puede activarse mediante una variedad de estímulos exógenos, que incluyen nigericina, gramicidina, ATP extracelular, toxinas proteicas formadoras de poros o, también, puede ser inducido por el flujo de salida de  $K^+$  (Xu et al., 2020), aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Platt et al., 2022), disminución de AMP cíclico celular (Lee GS 2012), liberación de ADN mitocondrial oxidado, desestabilización lisosómica, disfunción mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rovira-Llopis et al., 2018). Como puede apreciarse, estos estímulos son estructuralmente muy diferentes y si bien el mecanismo molecular del inicio del ensamblado de la plataforma de NLRP3 no es completamente conocido, se estima que NLRP3 no reconoce directamente estructuras moleculares particulares. Por lo tanto, es probable que los MAMPs y DAMPs activen el inflamasoma NLRP3 al inducir cambios en la homeostasis celular (Matikainen et al., 2020).

En respuesta al estímulo activador, la proteína NLRP3 se oligomeriza. Este proceso requiere de la unión de ATP o deoxiATP a su elemento NBD o NOD, evento que está altamente regulado por la actividad ATPasa del elemento NBD y por la concentración intracelular de  $K^+$ . Una vez que oligomeriza, la proteína NLRP3 recluta la proteína adaptadora ASC a través de interacciones de los dominios PYD. La presencia de ASC en este inflamasoma, da lugar a la formación de agregados supramoleculares de un tamaño comprendido entre 1 y 2  $\mu m$ , llamados specks o piroptosomas (Fernandes-Alnemri et al., 2007). Durante esta activación, se forma un único agregado por célula, que es el encargado de reclutar y activar la caspasa-1 a través de interacciones de los dominios CARD (Watanabe et al., 2021).

Como mencionamos, aun no es conocido en detalle el mecanismo molecular involucrado en el inicio de la formación de la plataforma del inflamasoma NLRP3. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la quinasa Ser/Thr NEK7 puede regular directamente la

activación de este inflamasoma a través de la interacción directa NLRP3-NEK7 (G. Liu et al., 2020; Sharif et al., 2019). La región N-terminal de NEK7 interactúa con las repeticiones C-terminales ricas en leucina (LRR) y el dominio de unión a nucleótidos (NOD) de NLRP3. NEK7 participa en la acetilación de los microtúbulos durante la activación del inflamasoma NLRP3. Se ha demostrado que NEK7 está involucrado en varias vías relacionadas con la activación del inflamasoma NLRP3, como la señalización de ROS (Weinberg et al., 2015), la salida de  $K^+$ , la desestabilización lisosomal y la señalización de NF- $\kappa$ B. Los ratones con deficiencia de NEK7 presentan una secreción reducida de IL-1 $\beta$  y reclutamiento atenuado de células inmunes (G. Liu et al., 2020; Sharif et al., 2019). A su vez, se ha demostrado que NEK7 está involucrado en enfermedades relacionadas con NLRP3 en humanos (G. Liu et al., 2020).

Posiblemente la activación de NLRP3 implica modificaciones postraduccionales y/o cambios conformacionales (Mangan et al., 2018; Song & Li, 2018). Humayun Sharif et al proponen que, para la activación del NLRP3, primero debe producirse la formación del complejo NLRP3-NEK7, y la conversión de NACHT de una conformación inactiva a una activa, para finalmente lograr la oligomerización de NLRP3 (Sharif et al., 2019). Esta transición conformacional puede requerir la unión de ATP ya que se ha demostrado previamente que NLRP3 posee actividad ATPasa. En forma análoga, para la activación de la proteína APAF-1, que contiene el dominio NACHT, se requiere la unión de ATP, aunque no la hidrólisis.

En la actualidad, se han utilizado inhibidores selectivos de la proteína NLRP3, como MCC950, 3,4-metilendioxi- $\beta$ -nitroestireno, CY-09, Tranilast y oridonina, tanto para profundizar en el estudio de la vía como para evaluar su potencial utilización terapéutica (G. Liu et al., 2020).

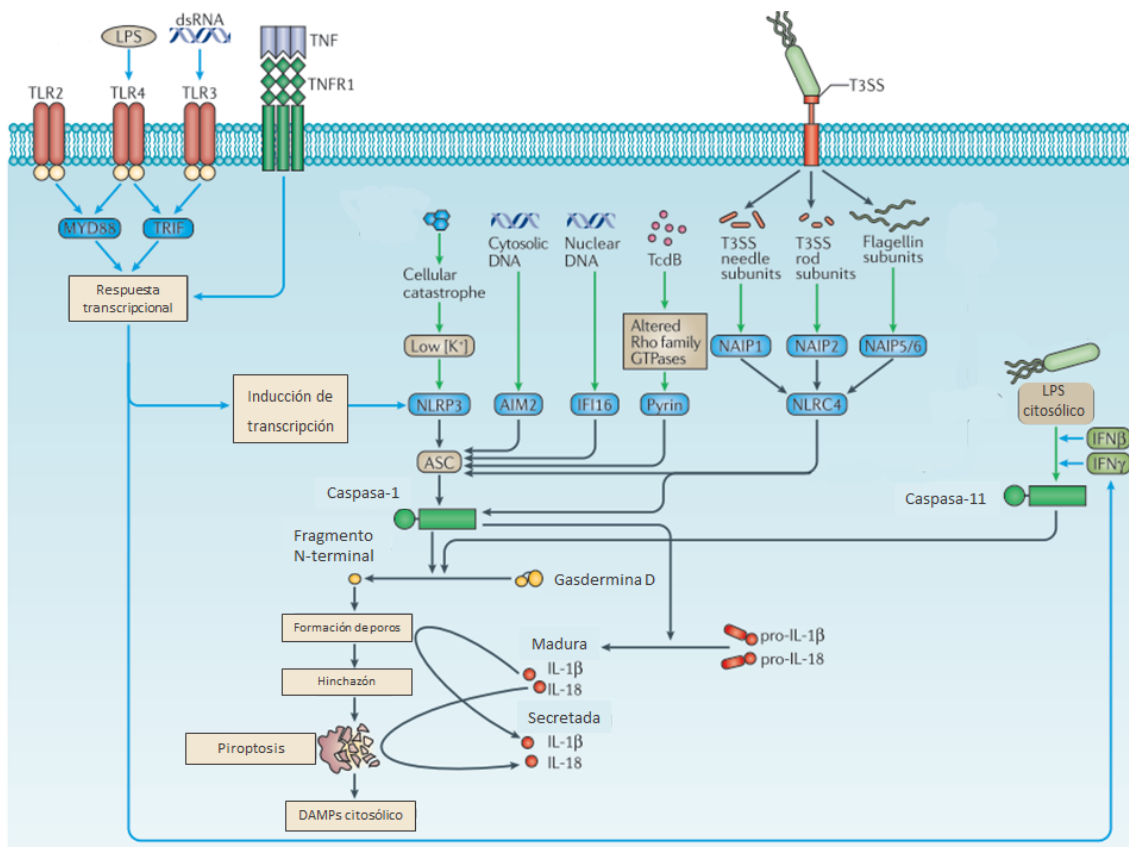
El MCC950 es el inhibidor de NLRP3 más específico, mejor caracterizado y el más empleado tanto en investigación básica como en una amplia gama de enfermedades inflamatorias relacionadas con NLRP3. MCC950 es un potente inhibidor altamente específico de la activación del inflamasoma NLRP3, debido a que bloquea la interacción entre NEK7 y NLRP3. Hasta el 2016 se contaba con el perfil farmacocinético detallado, pero el mecanismo de acción aún no se conocía.

Se sabía que MCC950 no afectaba el flujo de  $K^+$ , el flujo de  $Ca^{2+}$ , las interacciones NLRP3-NLRP3 o NLRP3-ASC y se habían descartado otros posibles objetivos como caspasa-1 (Primiano et al., 2016), finalmente el descubrimiento de NEK7 por dos grupos de investigación independientes permitió definir el mecanismo de inhibición de MCC950 (Chen et al., 2019). Ensayos en modelos experimentales mostraron que MCC950 inhibe la activación del inflamasoma NLRP3 y la secreción de IL-1 $\beta$  en ratones con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y mejora la inmunidad antitumoral. Además, MCC950 redujo la producción de IL-1 $\beta$  y atenuó la gravedad de la encefalomiелitis autoinmune experimental (Coll et al., 2014).



### 1.3 Bases moleculares de la muerte celular por Piroptosis

La piroptosis es una forma lítica de muerte celular programada que conduce a una rápida eliminación de las células dañadas durante la infección. Se desencadena por una vía canónica que implica la activación de inflammasomas que conduce a la activación de caspasa-1, o una vía no canónica impulsada por la activación de caspasa-4/5 (o caspasa-11 en ratón) (D. Tang, 2019) (Ilustración 17).



#### Ilustración 17. Piroptosis en respuesta a la infección. Vía canónica y no canónica

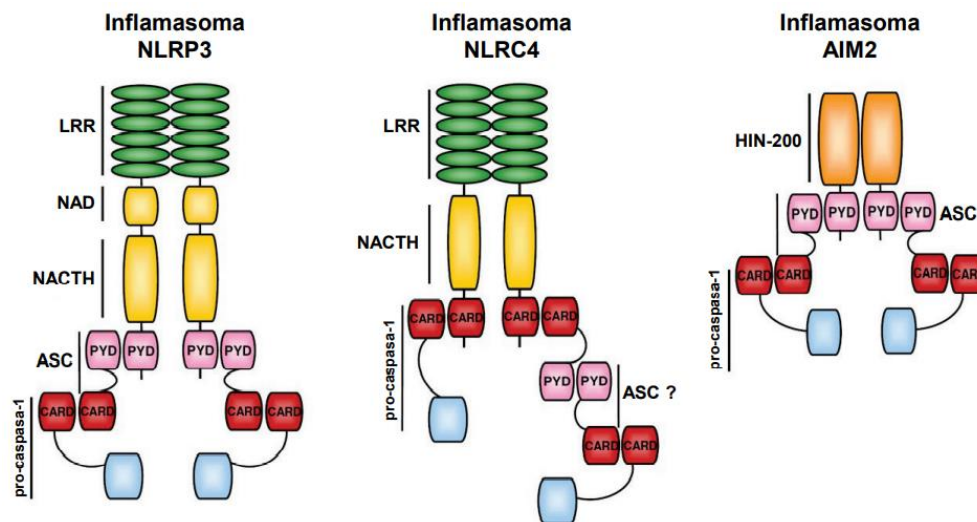
La piroptosis es iniciada por caspasa-1 o caspasa-11. La caspasa-1 es activada por uno de los varios inflammasomas. NLRP3 responde a numerosos agonistas, pero para ello es necesario que reciba un estímulo de cebado a través de receptores tipo Toll (TLR) o del factor de necrosis tumoral (TNF). AIM2 detecta ADN citosólico e IFI16 también detecta ácidos nucleicos virales. NLRC4 es activada por flagelinas bacterianas o el sistema de secreción de tipo III (T3SS). Por el contrario, la caspasa-11 es, en sí misma, el sensor de LPS citosólico. Similar a NLRP3, la caspasa-11 requiere cebado, pero esta vez por IFN de tipo I o IFN $\gamma$ . Tanto la caspasa-1 como la caspasa-11 clivan independientemente la Gasdermina D, a partir de la cual el fragmento amino-terminal liberado se asocia con la membrana celular y oligomeriza para formar el poro piroptótico. Además, la caspasa-1 convierte pro-IL-1 $\beta$  y la pro-IL-18 a sus formas maduras (en cambio, la caspasa-11 no puede hacer este clivaje). Adaptada de Jorgensen et al., 2017.

### 1.3.1 Vía canónica de la piroptosis

Como hemos mencionado, los inflammasomas son un complejo multiprotéico citosólico que se forman en respuesta a infecciones y señales de daño endógeno (Watanabe et al., 2021). Estos comprenden receptores tipo NOD (NLR) (dominios pirínicos de la familia NLR que contienen proteínas NLRP1, 2, 3, 6 y NLRC4) o no NLR (AIM2 e IFN $\gamma$ - proteína inducible 16 "IFI16") (Kesavardhana & Kanneganti, 2017).

La activación del inflammasoma requiere dos señales. En primer lugar, se necesita una "señal I, de cebado" como aquellas inducidas por ligandos de TLRs, IFNs o alarminas, que conducen a la activación de la vía intracelular de NF- $\kappa$ B. La segunda señal puede producirse mediante una amplia gama de estímulos, cuya naturaleza depende del sensor involucrado (es decir, miembros de la familia NLR, AIM2 o IFI16). Estos pueden incluir MAMPs derivados de patógenos, materiales particulados (sílice y asbesto) o DAMPs como ATP extracelular, ácido úrico y cristales de colesterol, o pueden involucrar eventos celulares adicionales, como eflujo de K<sup>+</sup>, daño mitocondrial y generación de ROS, o ruptura lisosomal (Kesavardhana & Kanneganti, 2017).

Tras la activación del inflammasoma, estas proteínas se oligomerizan y ensamblan con la proteína ASC que actúa como una proteína adaptadora la cual se une e induce la activación de la caspasa-1, formándose entonces la plataforma activa del inflammasoma, cuya estructura dependerá del sensor involucrado en la señal inicial (Zmora et al., 2017) (Ilustración 18).



**Ilustración 18. Ensamblaje de los inflammasomas**

Las proteínas NLRP3 y NLRC4, así como la proteína AIM2, son capaces de ensamblar inflammasomas. Lo hacen reclutando y activando la pro-caspasa-1 directamente a través de los dominios CARD (rosa) o indirectamente a través de la proteína ASC. Figura modificada de Eitel et al. 2011.

Cuando se activa, este complejo cliva a pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 generando sus formas activas y a GSDMD, produciendo fragmentos N-terminales que se multimerizan y se unen a la membrana celular interna, lo que lleva a la formación de poros de ~20 nm de diámetro que permiten la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 maduras, además de alarminas como IL-33, IL-1 $\alpha$  y HMGB1 (Kesavardhana & Kanneganti, 2017; Tang et al., 2019; Zhen & Zhang, 2019).

Existe un equilibrio entre la formación de poros y la reparación de la membrana celular, estableciéndose un balance que mantiene la viabilidad celular. Si el número de poros excede la capacidad de la maquinaria de reparación, la célula morirá por un proceso lítico denominado piroptosis (Tang et al., 2019).

### **1.3.2 Vía no canónica de la piroptosis**

Se ha demostrado que el LPS de las bacterias Gram negativas activa el inflamasoma de manera no canónica al unirse directamente en el citosol a la caspasa-4/5 en humanos y la caspasa-11 en ratón (Matikainen et al., 2020). Los fragmentos N-terminales de GSDMD se pueden generar mediante un mecanismo dependiente de caspasas-4/5 o caspasa-11, en presencia de LPS citosólico. En este caso, la caspasa-4/5 (o caspasa-11) se oligomeriza y activa, y este complejo genera la forma madura de GSDMD (Tang et al., 2019; Zhen & Zhang, 2019).

En contraste con la capacidad de procesamiento de la Gasdermina D, las caspasas-4/5/11 no canónicas son menos eficientes en el procesamiento directo de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 en comparación con la caspasa-1 (Qiu et al., 2017).

La activación no canónica del inflamasoma, mediada por caspasa-11, fue descubierta en ratones en el 2011 (Kayagaki et al., 2011). Estudios posteriores demostraron que la caspasa-4 y la caspasa-5, ortólogos de la caspasa-11 en ratón, funcionan como un inflamasoma no canónico en las células humanas (Knodler et al., 2014; Schmid-Burgk et al., 2015). A pesar de las similitudes entre caspasa-11 y caspasa-5, la mayoría de las publicaciones consideran que la caspasa-4 es el homólogo funcional de la caspasa-11 (Matikainen et al., 2020).

Se ha demostrado que la caspasa-4 está directamente involucrada en la detección de LPS mientras que el papel de la caspasa-5 en la detección de LPS sigue siendo poco claro (Casson et al., 2015). Además, la caspasa-5, pero no la caspasa-4, es inducible por LPS e IFNs, lo que también sugiere una función diferencial para estas caspasas.

El LPS bacteriano, un componente inmunogénico principal de la pared celular de las bacterias Gram negativas, es el MAMP esencial responsable del desarrollo de la inflamación durante estas infecciones bacterianas. El LPS es reconocido en el espacio extracelular por TLR4, tras la activación, dimeriza y recluta MyD88, que inicia la cascada de señalización por NF- $\kappa$ B, induciendo la transcripción de las citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Mazgaeeen & Gurung, 2020).

Esta señalización dependiente de MyD88 también sirve como un paso de cebado para la activación canónica del inflamasoma, al inducir la expresión del gen NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009). Durante el reconocimiento de LPS, el TLR4 también es endocitado, y en el compartimiento endosómico, envía señales a través de TRIF (IFN- $\beta$  inductor de adaptador que contiene el dominio TIR), lo que induce la producción de IFN tipo I (Kagan et al., 2008). En 2011, Kayagaki et al. (Kayagaki et al., 2011) demostraron por primera vez que la caspasa-11 es necesaria para el procesamiento proteolítico y la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos de ratón infectados con bacterias Gram-negativas, pero prescindible cuando las mismas células fueron infectadas con bacterias Gram-positivas o tratados con activadores del inflamasoma no bacterianos.

## **2. Piroptosis en la mucosa intestinal y posible asociación con la enfermedad celíaca**

Si bien se ha avanzado en el conocimiento de las vías de activación del inflamasoma, es importante destacar que los mecanismos de regulación, así como sus consecuencias biológicas en los tejidos son difíciles de establecer debido a la simultaneidad de señales. En este sentido, la información que se dispone sobre la piroptosis en el intestino delgado es muy limitada. Siendo ampliamente estudiado el inicio de esta vía debido a infecciones, pero poco abordado en condiciones no infecciosas (Christgen et al., 2020; Gong et al., 2020).

Como se mencionó, la información sobre procesos de muerte celular distintos a la apoptosis, asociados a la mucosa de pacientes celíacos es escasa. A su vez, dado que las diferentes vías inflamatorias y de muerte celular programada comparten factores, es difícil identificar el papel de una vía en particular.

La caspasa-1, por ejemplo, comparte sustratos con elementos de otras vías, como la caspasa-3 y Bid y, de esta forma, se conecta con la vía de muerte celular por apoptosis (Samir et al., 2020). A su vez, la activación de caspasa-8 podría contribuir a producir formas activas de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en el epitelio y clivar GSDMD amplificando la inflamación y la muerte celular programada (Xu et al., 2020).

Se encontró que IL-1 $\beta$  se libera activamente en los sobrenadantes de PBMC de pacientes con EC incubadas con gliadinas tratadas con pepsina-tripsina (K. M. Harris et al., 2008) y que los niveles séricos de IL-1 $\beta$  disminuyen en pacientes con EC después de 1 año con dieta libre de gluten (Manavalan et al., 2010), sugiriendo una activación del inflamasoma inducida por gliadinas que se revierte en los pacientes en tratamiento.

De manera similar, otro estudio utilizando PBMCs, mostró una mayor producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 luego del tratamiento con gliadinas digeridas con pepsina cuando se usaron células de pacientes celíacos en comparación con controles sanos. Es importante destacar que la liberación de estas citoquinas fue inhibida al bloquear la salida de K<sup>+</sup>, lo que sugiere que la activación del inflamasoma es necesaria (Palová-Jelínková et al., 2013).

Ensayos *in vitro* mostraron que el IFN $\gamma$  estimula la activación del inflamasoma dependiente de caspasa-1 y la producción de IL-18 en biopsias duodenales de pacientes celíacos. A su vez, IL-18 induce la producción de IFN $\alpha$  que expande el circuito proinflamatorio (Jarry et al., 2017).

A su vez, otros elementos críticos en la patogenia de EC tienen relación directa con el eje del inflamasoma, por ejemplo, se ha demostrado que el propio IFN $\gamma$  induce un aumento de la expresión de NLRP6, caspasa-1 y -5 en enterocitos aislados de pacientes celíacos (Pietz et al., 2017). También en estos pacientes se encontraron niveles elevados de ROS (Moretti et al., 2018) y DAMPs como IL-33 (Perez et al., 2020) o HMGB1 (Manti et al., 2017) quien curiosamente puede promover la activación de la piroptosis mediante la liberación de LPS en el citosol celular induciendo la activación de las caspasa-4/5 (Deng et al., 2018).

Por otro lado, empleando el modelo experimental de enteropatía hemos demostrado que el péptido gliadina p31-43 forma oligómeros (Herrera et al., 2019) e induce la formación del complejo ASC, en una línea reportera que evidencia la activación del inflamasoma *in vitro* (Gómez Castro et al., 2019).

La administración por vía intragástrica causa daño a la mucosa de intestino delgado proximal de ratones C57BL/6, mediante la inducción de una respuesta inflamatoria asociada con la producción de IFN tipo I e IL-1 $\beta$ , de una manera dependiente de MyD88 (Araya et al., 2016), NLRP3 y caspasa-1 (Gómez Castro et al., 2019). Empleando ratones C3H-HeJ (deficiente en la señalización de TLR4), mostramos que este efecto, cuando el péptido se administra intraluminalmente, no es dependiente de TLR4, lo que nos permitió descartar que los resultados observados fuesen artefactos, debidos a contaminación por LPS (Araya et al., 2016).

Por otro lado, estudios realizados por el grupo del Dr. Maiuri, muestran que este péptido también puede inducir inflamación al unirse e inhibir la subunidad del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que en las células epiteliales intestinales llevaría a estrés epitelial, activación del inflamasoma y liberación de IL-1 $\beta$  (Maiuri et al., 2019).

Por lo tanto, el empleo del péptido p31-43 parece ser un buen modelo para caracterizar la respuesta inflamatoria mediada por el inflamasoma en intestino delgado.

## Justificación

En el capítulo anterior, demostramos que la apoptosis efectivamente juega un papel clave en los procesos de muerte celular programada que ocurren en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad celíaca. Sin embargo, los procesos inflamatorios persistentes en la mucosa sugieren que otras vías de muerte celular programada podrían estar involucradas.

Debido a que tanto las vías inflamatorias como de muerte celular comparten factores, es posible que estos mecanismos presenten solapamiento de mediadores, más aún cuando se estudia un tejido completo, como la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca, donde ocurre un proceso crónico de daño tisular. Por lo tanto, en este capítulo nos centraremos en el estudio de la activación del inflamasoma y la consecuente muerte proinflamatoria por piroptosis.

## Objetivos específicos

- Analizar la implicancia de la inducción de piroptosis en la muerte celular en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca.
- Determinar la participación de los mediadores centrales de la muerte celular por piroptosis.
- Evaluar si el p31-43 induce activación del inflamasoma en intestino delgado proximal en un modelo experimental de enteropatía.
- Confirmar, mediante un modelo *in vivo*, la activación del inflamasoma NLRP3 en los mecanismos de daño en la mucosa intestinal, mediados por p31-43, empleando inhibidores selectivos de la vía.

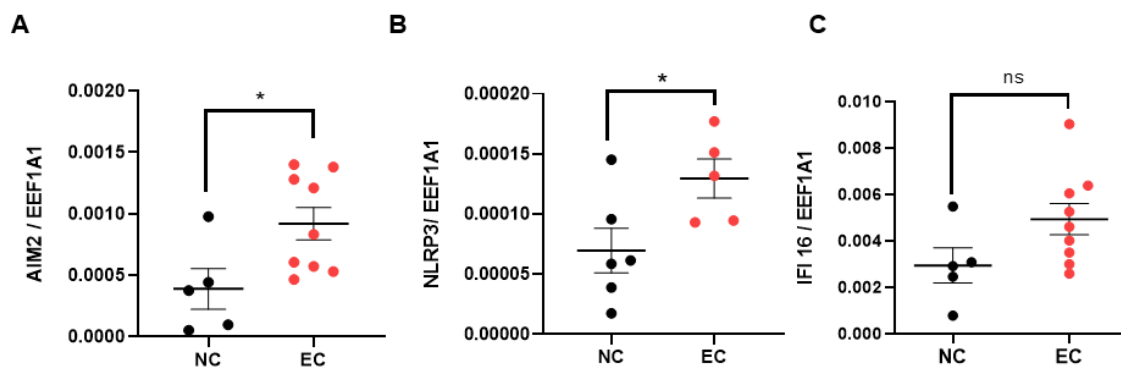
## Resultados

### 1. Análisis de la expresión de componentes claves de la piroptosis en la mucosa duodenal de pacientes celíacos

#### 1.1 Inflamasomas y su implicancia en la activación de la vía canónica en enfermedad celíaca

Como principales miembros de la activación canónica de la piroptosis hemos decidido estudiar la expresión de diversos inflamasomas claves a nivel del intestino delgado como AIM2, NLRP3 e IFI16 (Kim et al., 2016; Zmora et al., 2017).

Los resultados de los estudios mediante qPCR mostraron un incremento de la expresión de AIM2 y NLRP3 en pacientes celíacos respecto de los controles, mientras que IFI16, aunque mostró la misma tendencia, no presentó diferencias significativas entre ambos grupos estudiados (**Figura 14.A-C**). Estos resultados sugieren que la mayor expresión de AIM2 y NLRP3 podría relacionarse con un aumento de su actividad y potencialmente, con la activación de la vía de la piroptosis en duodeno de pacientes celíacos.



#### **Figura 14. Expresión de inflamasomas en mucosa duodenal**

Resultados de qPCR para el gen **A. AIM2** (NC = 5, EC = 9). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados **B. NLRP3** (NC = 6, EC = 5). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados **C. IFI16** (NC = 5, EC = 9). ns; Prueba t-Student para datos no pareados. Todos referidos a EEF1A1 como gen de referencia.

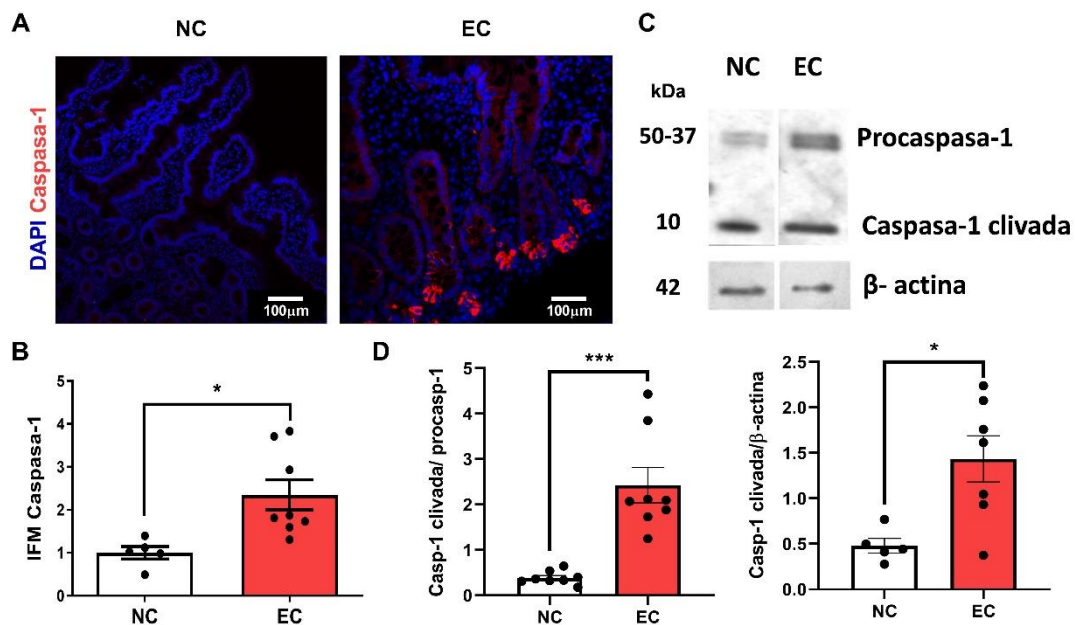
#### 1.2 Estudio de la expresión de caspasa-1 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos

Para comenzar el análisis sobre el rol de la vía canónica de la piroptosis en el intestino delgado evaluamos la expresión de caspasa-1, como elemento central en esta vía. Además, como es posible determinar su estado activo mediante diversas técnicas, nos permitió caracterizar funcionalmente la actividad del inflamasoma, en especial, considerando que

AIM2 y NLRP3 mostraron inducción de su expresión en el duodeno de los pacientes celíacos.

La evaluación por inmunofluorescencia indirecta mostró un incremento en la expresión de caspasa-1 en cortes histológicos de la mucosa duodenal de pacientes celíacos (EC) en comparación con los individuos no celíacos (NC) (Figura 15.A-B). Las imágenes obtenidas revelaron que los pacientes celíacos presentan una expresión aumentada de caspasa-1 principalmente en la región del fondo las criptas, patrón de distribución muy llamativo que requerirá de futuros estudios (Figura 15.A).

El análisis del extracto de proteínas obtenido de las piezas de biopsias duodenales mediante western blot confirmó que este aumento se debía a la presencia de una mayor cantidad de caspasa-1 clivada, es decir de su versión activa, evidenciada tanto cuando se estudia la relación de caspasa-1 clivada: procaspasa-1, como cuando se analiza cada una respecto del control de carga que en este caso es  $\beta$ -actina (Figura 15.C-D).



**Figura 15. Mayor expresión de caspasa-1 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos**

**A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta de caspasa-1 en la mucosa duodenal de pacientes con EC y NC. Caspasa-1 (rojo), Núcleos (azul). **B.** Intensidad de fluorescencia media de la marcación de caspasa-1 en secciones de mucosa duodenal (NC = 5, EC = 8). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **C.** Imágenes representativas por western blot de fragmentos de caspasa-1 en pacientes celíacos (EC) y no celíacos (NC). Se utilizó  $\beta$ -actina como proteína de control de carga. **D. Izquierda:** análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de caspasa-1 clivada: procaspasa-1 en pacientes celíacos (EC = 8) y no celíacos (NC = 8). \*\*\*  $p < 0,001$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **Derecha:** Análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de caspasa-1 clivada:  $\beta$ -actina en pacientes con EC y NC. \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

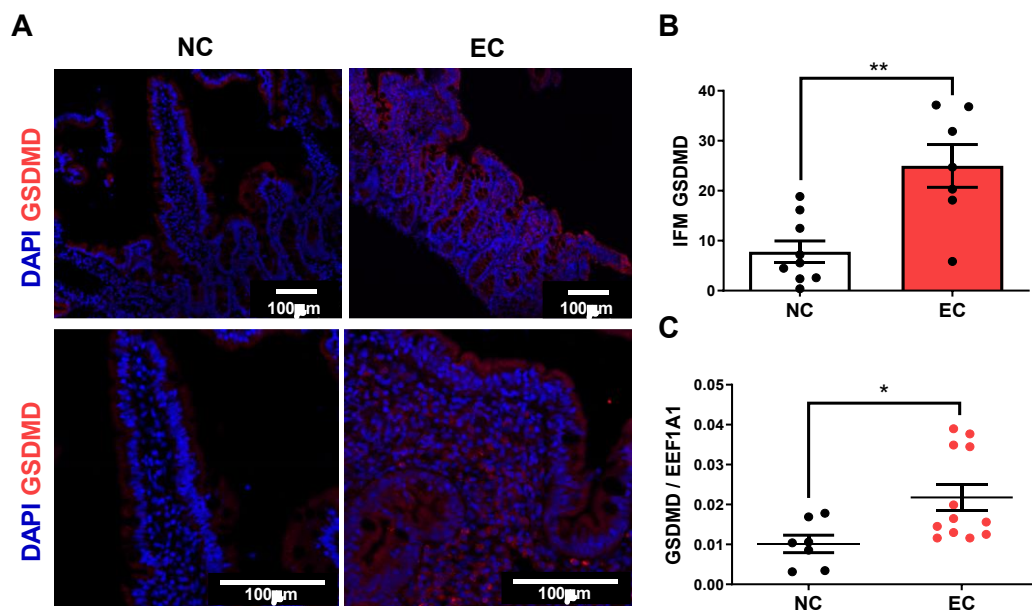


### 1.3 Estudio de la expresión de GSDMD en la mucosa duodenal de pacientes celíacos

Dado que hemos encontrado un aumento de la forma activa de caspasa-1 en el duodeno de pacientes celíacos, nos propusimos evaluar si la vía del inflammasoma conducía a la generación de fragmentos formadores de poros de GSDMD por los que se liberan citoquinas y DAMPs, y como mencionamos, en situación de desbalance del sistema de reparación de membranas, conducen a la lisis de la célula.

La evaluación por inmunofluorescencia indirecta mostró expresión incrementada de GSDMD en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos en comparación con individuos de la población control (Figura 16.A-B). Esto correlacionó con niveles más altos de ARNm, determinado mediante qPCR, en extractos de ARN total obtenido de las piezas de biopsias duodenales (Figura 16.C).

Las imágenes obtenidas revelaron que los pacientes celíacos presentan una expresión aumentada de GSDMD en el epitelio y la *lamina propria* (Figura 16.A). En unos pocos casos, se observó un patrón similar en la expresión epitelial de GSDMD en las muestras de pacientes control, sin embargo, estos presentaron una menor intensidad de fluorescencia.



**Figura 16. Mayor expresión de GSDMD en epitelio y lamina propria de intestino delgado de pacientes celíacos**

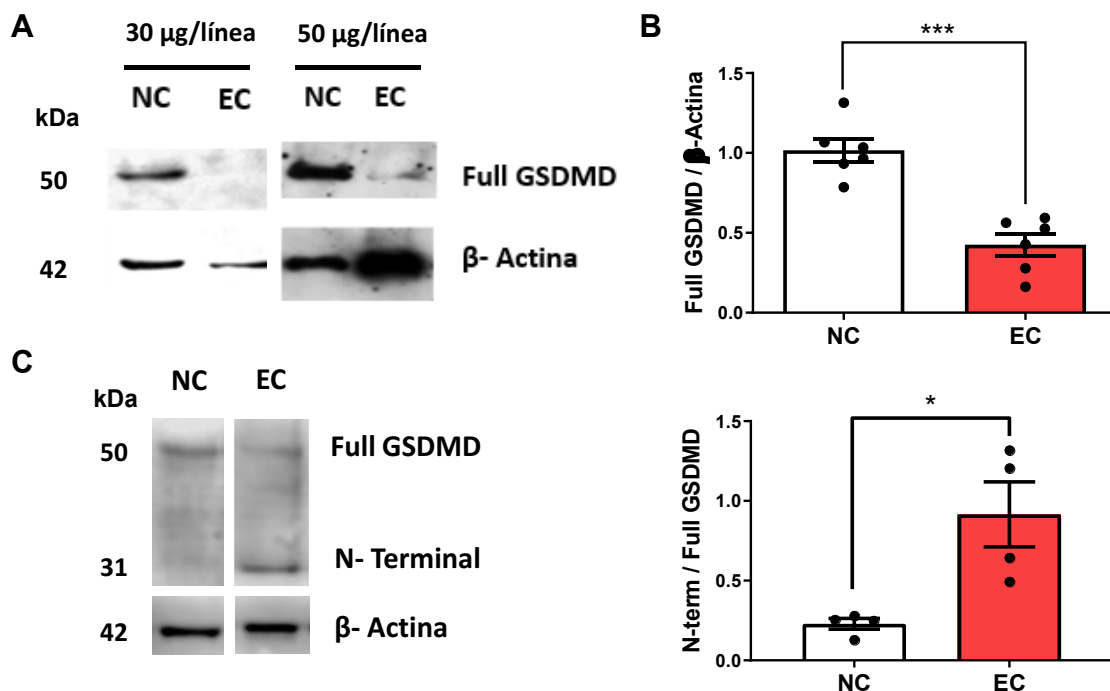
A. Imágenes representativas de ensayos de inmunofluorescencia indirecta de GSDMD en la mucosa duodenal de pacientes celíacos (EC) y no celíacos (NC). GSDMD (rojo), Núcleos (azul). B. Intensidad de fluorescencia media de GSDMD en secciones de mucosa duodenal. (NC = 9, EC = 7). \*\*  $p < 0,01$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. C. Análisis por qPCR

de los niveles de ARNm de GSDMD (NC = 7, EC = 12). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

Con el fin de realizar una evaluación cuantitativa de la expresión de GSDMD y sus fragmentos, se analizó mediante western blot, la fracción de proteínas totales obtenidas a partir de biopsias duodenales de pacientes celíacos y controles.

En primer lugar, utilizamos un anticuerpo anti-GSDMD humana (ab210070, Abcam) que no permitió evidenciar los fragmentos de GSDMD a pesar de aumentar considerablemente la cantidad de proteína empleada en el desarrollo de la técnica (Figura 17.A-B). Por esa razón, empleando este anticuerpo basamos nuestro análisis en la disminución de la cantidad de GSDMD completa (Full GSDMD). Para nuestra sorpresa, al analizar las mismas muestras utilizando un anticuerpo anti-GSDMD de ratón (ab225867, Abcam) pudimos evidenciar un incremento de la fracción N-terminal de GSDMD. Este anticuerpo es muy útil en el análisis de muestras de intestino en el modelo murino, sin embargo, esta reactividad compartida no estaba descrita en el instructivo del proveedor (Figura 17.C).

Estos hallazgos sugieren la activación de GSDMD en pacientes celíacos y confirma la activación del inflammasoma y posible rol de la piroptosis en la mucosa duodenal de pacientes celíacos.



**Figura 17. Mayor expresión de fragmento N-terminal de GSDMD en pacientes celíacos**

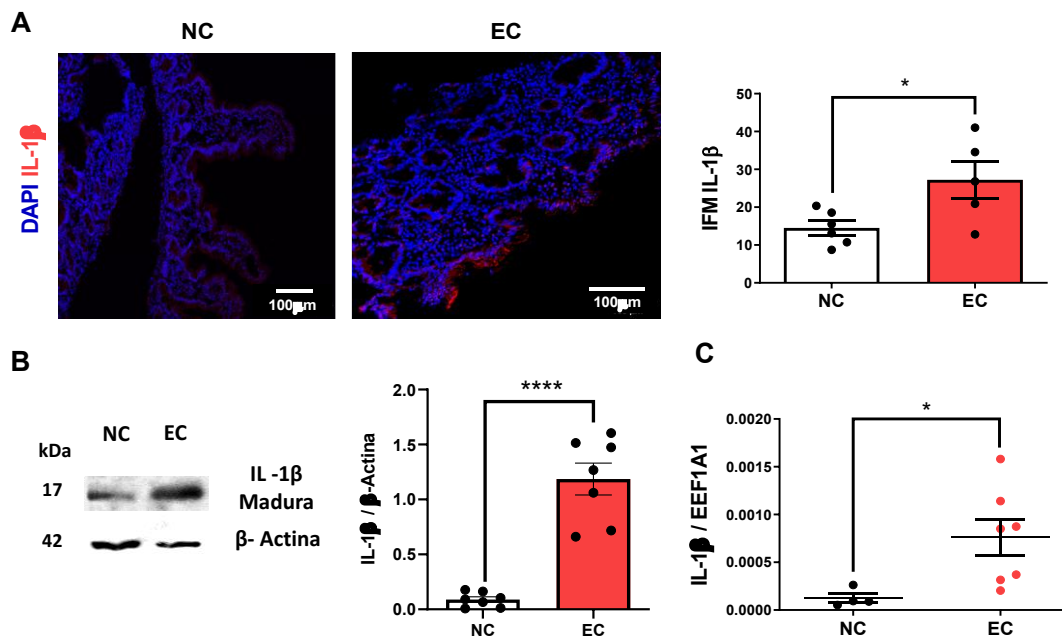
**A.** Imágenes representativas por western blot de Full GSDMD en pacientes celíacos (EC) y de población control (NC), empleando el anticuerpo ab210070, Abcam sembrando 30 y 50µg de proteína por línea. Se utilizó β-actina como proteína de control de carga. **B.** Análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de Full GSDMD: β-actina (EC = 6)

o (NC = 6). \*\*\*  $p < 0,001$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **C. Izquierda:** Imágenes representativas por western blot de fragmento N-terminal de GSDMD en EC y NC. Cuando se utilizó el anticuerpo primario ab225867, Abcam. Se utilizó  $\beta$ -actina como proteína de control de carga. **Derecha:** análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de N-terminal GSDMD: Full GSDMD (EC = 4) o (NC = 4). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

### 1.4 Estudio de la expresión de IL-1 $\beta$ en mucosa duodenal de pacientes celíacos

El ensamblado del inflamasoma conduce a la activación de caspasa-1 la que, a su vez, a partir de pro-IL-1 $\beta$  genera la forma activa de la citoquina que es liberada a través de los poros formados en la membrana plasmática por la oligomerización del dominio N-terminal de GSDMD.

Por lo tanto, dado que el evento final en la activación del inflamasoma es la liberación de IL-1 $\beta$ , estudiamos su expresión en cortes de biopsias duodenales de pacientes celíacos y de la población control. Los estudios por inmunofluorescencia indirecta mostraron un aumento de expresión tanto en epitelio como en células de la *lamina propria* de pacientes celíacos (Figura 18.A). En el análisis por qPCR del ARNm total obtenido de las piezas de biopsias duodenales, se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$  en pacientes celíacos comparados con la población control (Figura 18.B). Para evaluar la forma activa de IL-1 $\beta$ , se realizó un análisis mediante western blot donde la cuantificación de la intensidad de las bandas mostró un aumento significativo en la expresión de la forma activa de IL-1 $\beta$  en los pacientes con enfermedad celíaca (Figura 18.C).



**Figura 18. Mayor expresión de IL-1 $\beta$  en el duodeno de pacientes celíacos**

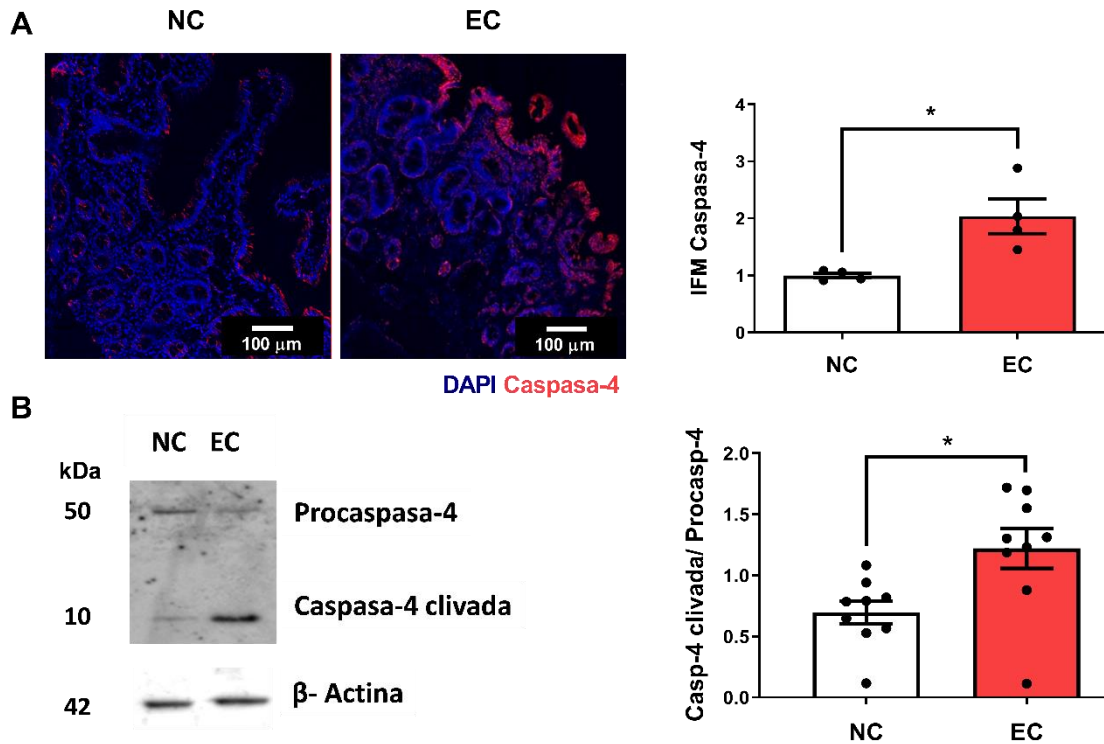
**A.** Izquierda: Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia indirecta de IL-1 $\beta$  en la mucosa duodenal de pacientes celíacos (EC) y de población control (NC). IL-1 $\beta$  (rojo), Núcleos (azul). Derecha: Intensidad de fluorescencia media de la marcación de IL-1 $\beta$  en secciones de mucosa duodenal. (NC = 5, EC = 5). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **B.** Izquierda: Imágenes representativas del análisis por western blot de fragmentos de IL-1 $\beta$ . Se utilizó  $\beta$ -actina como proteína de control de carga. Derecha: análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de IL-1 $\beta$  madura:  $\beta$ -actina (NC = 7, EC = 7). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **C.** Análisis por qPCR de la expresión del gen de IL-1 $\beta$ , empleando *EEF1A1* como gen de referencia (NC = 5, EC = 7). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

**1.5 Activación de caspasa-4 en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca**

Finalmente, luego de haber documentado la inducción de la vía canónica de la piroptosis mediante la demostración del aumento en la expresión de los inflamasomas estudiados, sumado a la activación de caspasa-1 y GSDMD, con la consecuente liberación de IL-1 $\beta$ , decidimos evaluar caspasa-4 como representante de la activación no canónica de la piroptosis.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se demostró la existencia de una mayor expresión de esta caspasa en la mucosa de los pacientes celíacos respecto de los controles. La mayor intensidad de fluorescencia se encontró principalmente en la región epitelial y del fondo de las criptas, aunque también se encontró un aumento a nivel de la *lamina propria* (Figura 19.A).

Para estudiar si ese incremento era producto de la versión activa de la caspasa-4 se procedió a analizar, mediante la técnica de western blot, homogenatos proteicos obtenidos a partir de piezas de biopsias intestinales (Figura 19.B). Evidenciamos que, efectivamente, el incremento de expresión de caspasa-4 se debía a un aumento de su versión activa, pudiendo sugerir entonces una implicancia de la vía no canónica de la piroptosis.



**Figura 19. Mayor expresión de caspasa-4 en el intestino delgado de pacientes celíacos**

**A. Izquierda:** Imágenes representativas de marcación para caspasa-4 en el intestino delgado de pacientes celíacos y controles. Tinción DAPI para núcleos (azul), caspasa-4 en rojo. **Derecha:** Intensidad de fluorescencia media de la marcación de caspasa-4 en secciones de mucosa duodenal de EC ( $n = 4$ ) y NC ( $n = 4$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **B.** Imagen de western blot representativo y análisis cuantificación de la activación de caspasa-4 expresada como la relación de caspasa-4 clivada: Procaspasa-4 en EC ( $n = 9$ ) y NC ( $n = 9$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student para datos no apareados.

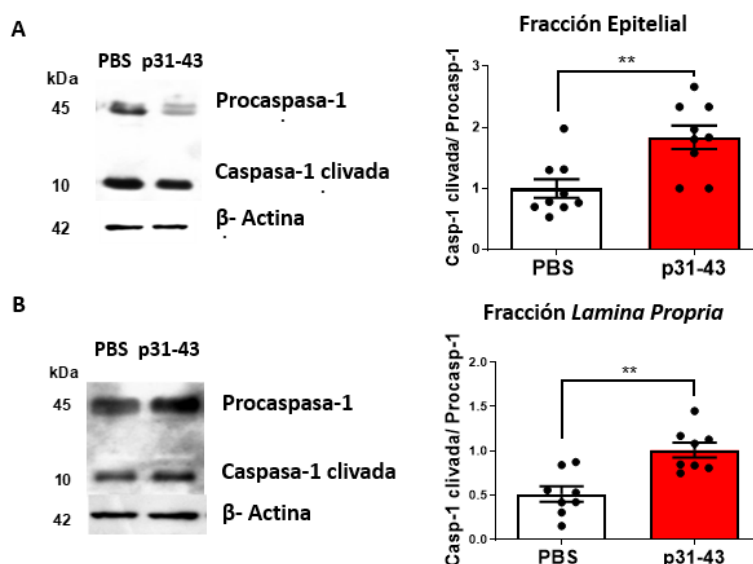
## 2. Evaluación de muerte celular por piroptosis en un modelo murino de enteropatía

Dado que en nuestro grupo de trabajo hemos desarrollado un modelo de enteropatía en ratones wild type (C57BL/6), donde se observó que el daño a la mucosa del intestino proximal, inducido mediante la administración intragástrica del péptido de gliadinas p31-43, es dependiente de NLRP3 y caspasa-1 (Gómez Castro et al., 2019), consideramos que resulta un excelente modelo para estudiar la activación del inflammasoma NLRP3 *in vivo* y evaluar si la muerte celular por piroptosis participa en este modelo experimental de enteropatía. Es importante destacar que este modelo nos permite estudiar por separado la fracción epitelial y de *lamina propria*, aspecto que no nos fue posible evaluar en las muestras provenientes de pacientes.

## 2.1 Análisis de la inducción de piroptosis en el epitelio y *lamina propria* intestinal tras la administración intragástrica de p31-43 en un modelo murino de enteropatía

Con el fin de evaluar el rol de la activación del inflammasoma en el daño a la mucosa intestinal inducido por la administración intragástrica de p31-43, nos interesó estudiar si se encuentran sobre-expesadas las formas activas de caspasa-1, IL-1 $\beta$  y GSDMD, como elementos centrales de la vía.

Para ello, mediante western blot de extractos de proteínas totales obtenidos de la fracción epitelial y de *lamina propria* de intestino delgado proximal de ratones luego de 16hs del tratamiento por vía intragástrica con p31-43 o vehículo (PBS), se evaluaron los niveles de caspasa-1. Como se muestra en la **Figura 20.A-B**, la administración de p31-43 generó un aumento significativo de la relación caspasa-1 activa/pro:caspasa-1 tanto en la fracción epitelial como en la de *lamina propria* de intestino delgado proximal.



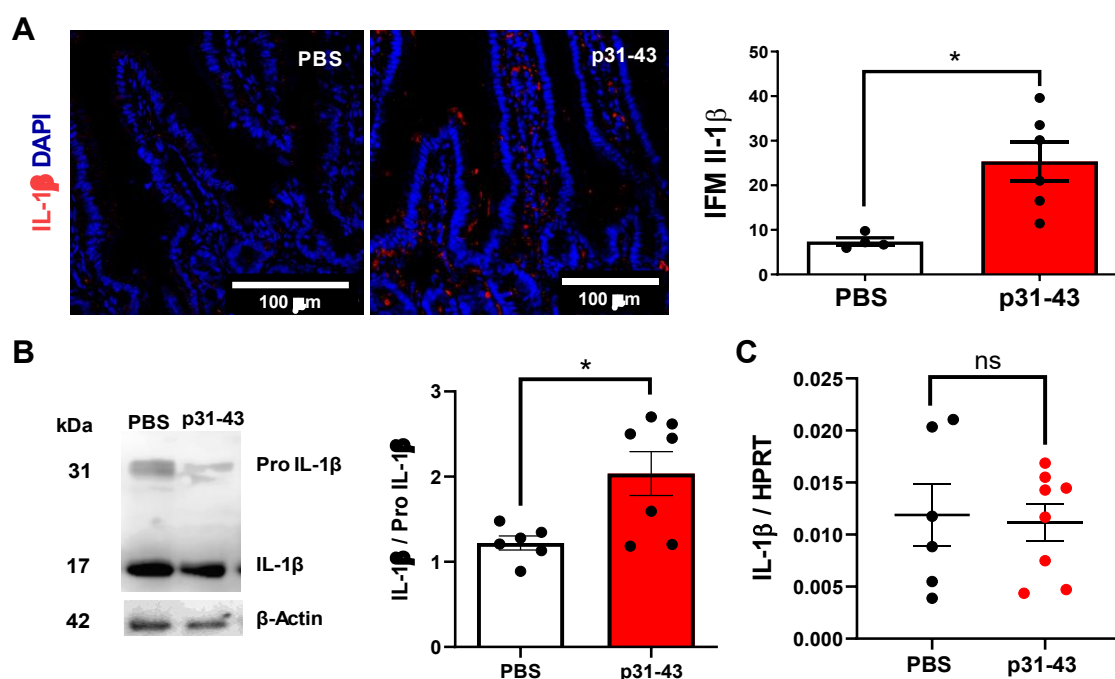
**Figura 20. Aumento de la expresión de caspasa-1 activa en ratones tratados con p31-43**

**A.** Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la activación de caspasa-1 expresada como la proporción de caspasa-1 clivada: procaspasa-1 en fracciones epiteliales 16hs después de la administración de p31-43 (20  $\mu$ g/ratón) ( $n = 8$ ) o PBS ( $n = 8$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; Prueba t de Student para datos no apareados. **B.** Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la activación de caspasa-1 expresada como la proporción de caspasa-1 clivada: pro:caspasa-1 en fracción lamina propria después de la administración de p31-43 ( $n = 8$ ) o PBS ( $n = 8$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; Prueba t de Student para datos no apareados.

Siguiendo con el esquema de trabajo planteado, mediante inmunofluorescencia indirecta en cortes histológicos de intestino delgado proximal de ratones tratados con p31-43 o

vehículo (PBS), se evaluaron los niveles de IL-1 $\beta$ . El análisis semicuantitativo de la intensidad de la fluorescencia mostró un aumento significativo de la expresión de IL-1 $\beta$  en ratones tratados con p31-43 (**Figura 21.A**). Con interés en establecer cuantitativamente la relación entre la IL-1 $\beta$  funcional y su precursor, se realizaron estudios sobre extractos de proteínas totales de intestino delgado de ratones tratados mediante la técnica de western blot. En la **Figura 21.B**, observamos que, en el intestino delgado proximal, el tratamiento con p31-43 por vía intragástrica generó un aumento significativo en la relación IL-1 $\beta$  madura: pro-IL-1 $\beta$  en comparación con los ratones tratados con PBS. Sin embargo, no observamos un incremento en la expresión del mensajero (**Figura 21.C**).

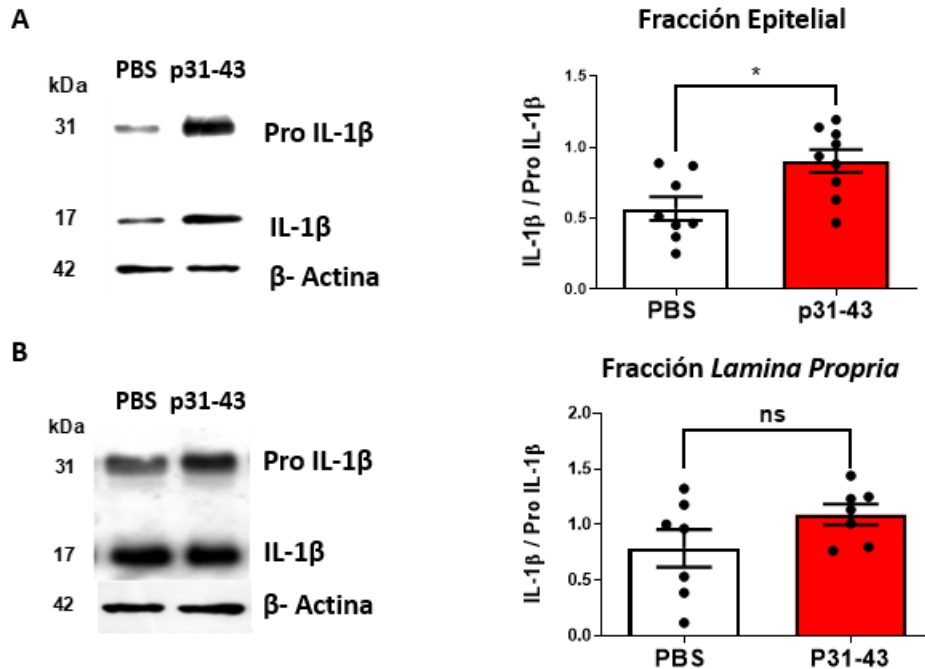
Para profundizar en el análisis se realizaron estudios mediante la técnica de western blot, sobre las fracciones separadas de proteínas extraídas de intestino delgado de animales tratados, y se demostró un aumento en la relación IL-1 $\beta$  madura: pro-IL-1 $\beta$  en el epitelio y una tendencia positiva pero no significativa, para la fracción de *lamina propria* (**Figura 22**). Estos hallazgos sugieren que la piroptosis contribuye a la muerte celular programada en el intestino delgado en este modelo.



**Figura 21. Inducción de piroptosis en ratones tratados con p31-43**

**A.** *Izquierda:* Imágenes representativas de la marcación para IL-1 $\beta$  de secciones de intestino delgado de ratones C57BL/6, 16 h después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de p31-43. Tinción DAPI para núcleos (azul), IL-1 $\beta$  en rojo. *Derecha:* Intensidad de fluorescencia de IL-1 $\beta$  en secciones histológicas de intestino delgado 16 h después de la administración de p31-43 ( $n = 4$ ) y en controles ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba  $t$  de Student para datos no apareados. **B.** Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la activación de IL-1 $\beta$  expresada como la proporción de IL-1 $\beta$  madura: pro-IL-1 $\beta$  en porciones de tejido entero de ratones 16 h después de la administración de p31-43 ( $n = 7$ ) o

PBS ( $n = 7$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba  $t$  de Student para datos no apareados. **C.** Análisis por qPCR de la expresión del gen de IL-1 $\beta$ , empleando HPRT como gen de referencia en muestras de intestino delgado de ratones tratados con p31-43 ( $n = 6$ ) o con PBS ( $n = 8$ ). ns; Prueba  $t$ -Student para datos no apareados.



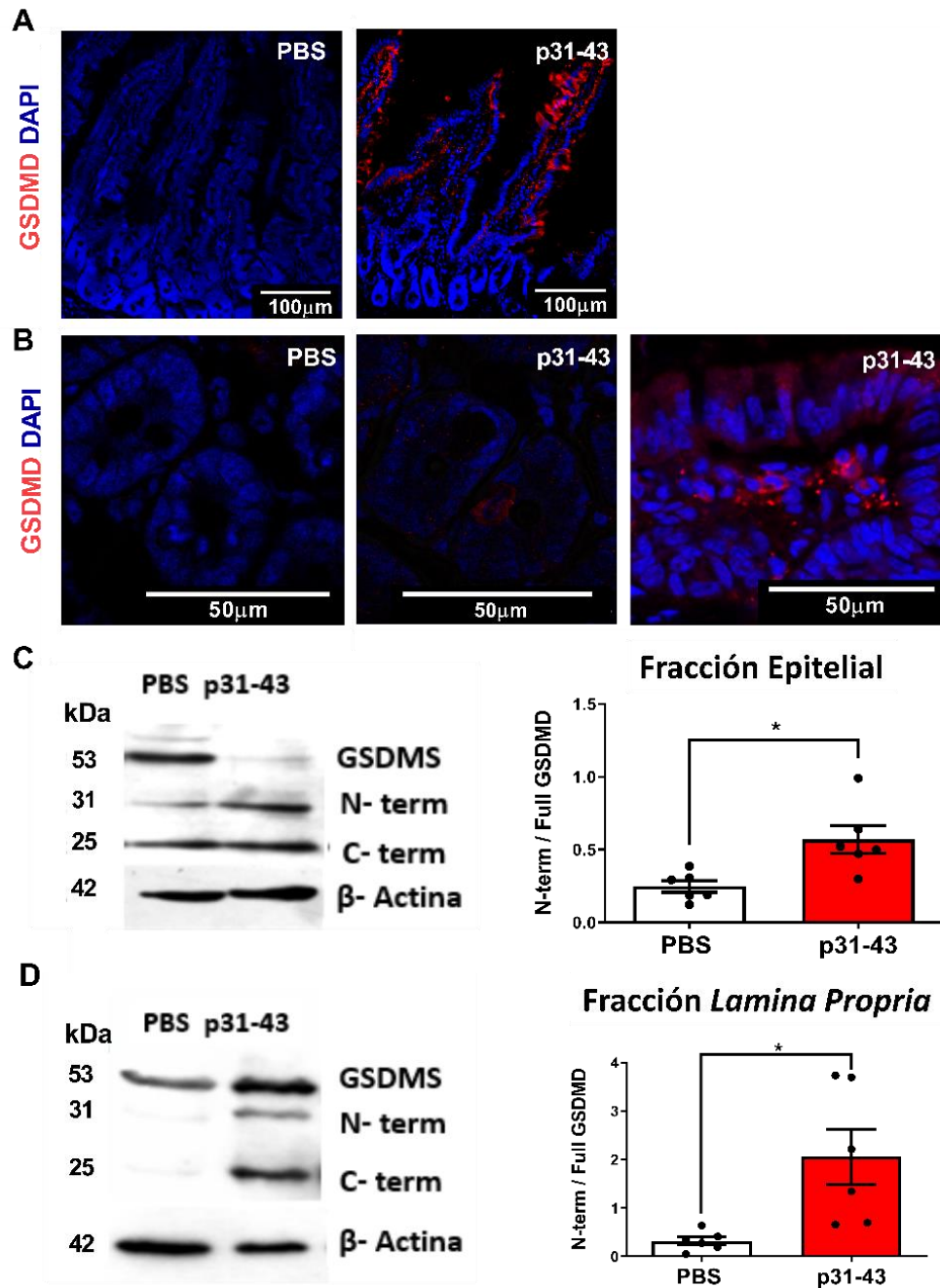
**Figura 22. Aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  activa en ratones tratados con p31-43**

**A.** Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la activación de IL-1 $\beta$  expresada como la proporción de IL-1 $\beta$  madura: pro-IL-1 $\beta$  en la fracción epitelial 16h después de la administración de p31-43 ( $n = 8$ ) o PBS ( $n = 8$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba  $t$  de Student para datos no apareados. **B.** Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la activación de IL-1 $\beta$  expresada como la proporción de IL-1 $\beta$  madura: pro-IL-1 $\beta$  en la fracción lamina propria 16h después de la administración de p31-43 ( $n = 8$ ) o PBS ( $n = 8$ ). ns; Prueba  $t$  de Student para datos no apareados.

Como mencionamos, la activación del inflammasoma conduce a la proteólisis de GSDMD y a la liberación de su fragmento N-terminal, cuyo autoensamblado forma poros en la membrana celular, siendo el evento distintivo de la piroptosis (Kesavardhana et al., 2020).

El análisis por inmunofluorescencia indirecta sobre secciones de intestino delgado proximal de ratones tratados con p31-43 o PBS, mostró un aumento de la expresión de GSDMD en la lamina propria de los ratones tratados, así como en las células epiteliales. También observamos expresión de GSDMD en algunas células de las criptas (Figura 23.A). El análisis por western blot mostró niveles aumentados del fragmento N-terminal de GSDMD tanto en células del epitelio como de la lamina propria de los ratones tratados con p31-43 (Figura 23.B).





**Figura 23. Activación de GSDMD en ratones tratados con p31-43**

**A.** Imágenes representativas de marcación para GSDMD de la región epitelial del intestino delgado de ratones C57BL/6, 16 h después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de gliadina p31-43. (Izquierda: sección completa, Derecha: área alrededor de las criptas). Tinción DAPI para núcleos (azul), GSDMD en rojo. **B.** Imágenes de western blot representativo y análisis cuantificación de la activación de GSDMD expresada como la relación de N-terminal: GSDMD en la fracción epitelial, 16 h después de la administración de p31-43 ( $n = 6$ ) o PBS ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student para datos no apareados. **C.** Imágenes representativas de marcación para GSDMD de la región de la lamina propia del intestino delgado. Tinción DAPI para núcleos (azul), GSDMD en rojo. **D.** Imágenes de western blot representativo y análisis cuantitativo de la activación de GSDMD expresada como la

relación de N-terminal: GSDMD en lamina propria, 16 hs después de la administración de p31-43 ( $n = 6$ ) o PBS ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student para datos no apareados.

En conjunto, el aumento de caspasa-1 activa, IL-1 $\beta$  y los fragmentos N-terminales de GSDMD, indican que la piroptosis puede contribuir a la muerte celular programada en el daño al intestino delgado inducido por la administración intragástrica de p31-43.

## 2.2 Empleo de inhibidores en ensayos *in vivo* para la evaluación de la actividad del inflammasoma en intestino delgado murino

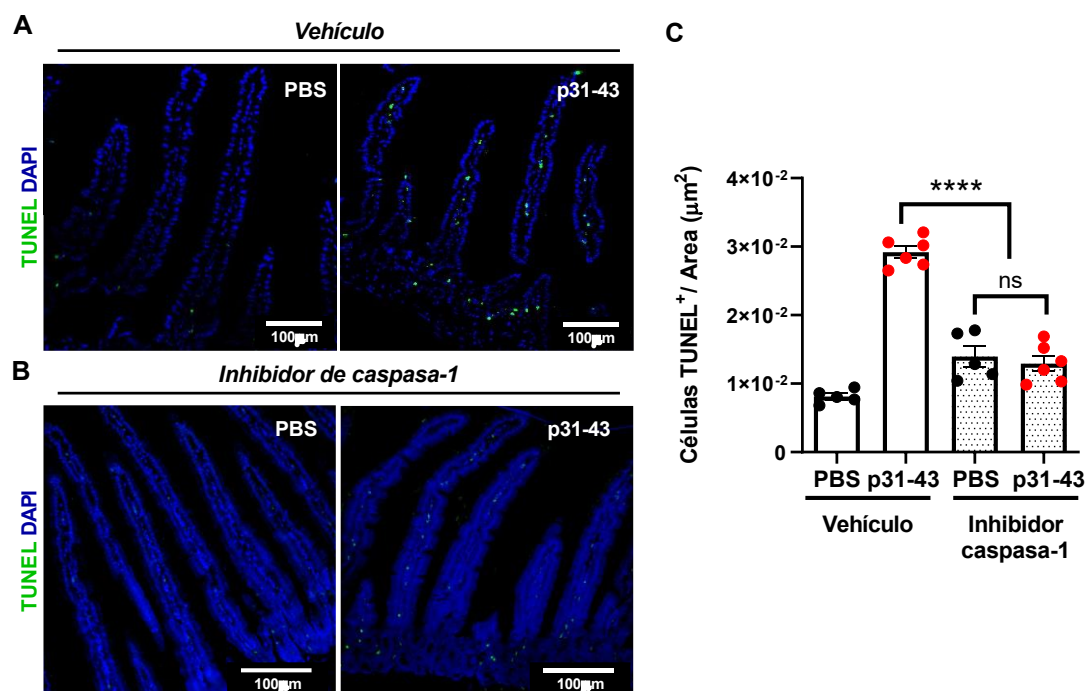
En ensayos previos, hemos demostrado que la administración intragástrica del p31-43 en ratones deficientes para caspasa-1/11 o NLRP3 no induce daño en la mucosa del intestino delgado, ya que no se evidenció una modificación de los parámetros altura de la vellosidad/profundidad de la cripta (V/C) o recuento del número de linfocitos intraepiteliales (IELs) al compararlos con ratones control. Es importante destacar que, aunque no fue significativo, el número de IELs permanecía un poco más elevado en los NLRP3<sup>-/-</sup> en comparación con los caspasa-1<sup>-/-</sup> (Gómez Castro et al., 2019).

En base a estos resultados, se pudo inferir que NLRP3 y caspasa-1, serían moléculas necesarias en la inducción del daño causado por p31-43, y dado que los animales deficientes NLRP3<sup>-/-</sup> y caspasa-1<sup>-/-</sup> seguramente tienen alteraciones en la fisiología de la respuesta inmune del intestino, especialmente considerando la interacción con la microbiota, nos propusimos estudiar el rol *in vivo* del inflammasoma en animales *wild type* con bloqueos selectivos mediante inhibidores farmacológicos para NLRP3, caspasa-1 e IL-1 $\beta$ .

### 2.2.1 La inhibición de caspasa-1 *in vivo* previene la muerte de células epiteliales inducida por p31-43

Para evaluar el rol de caspasa-1 en el intestino delgado se empleó el inhibidor selectivo Ac-YVAD-cmk (InvivoGen, EE. UU). Los animales fueron tratados con el inhibidor o el vehículo (DMSO), por vía intraperitoneal, 30 minutos antes de la administración intragástrica de p31-43 o PBS.

Se empleó la reacción de TUNEL para determinar el número de células muertas en el intestino delgado. Se observó una disminución significativa del número de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propria de los ratones tratados con el inhibidor de caspasa-1 y p31-43 cuando se compara con el lote que recibió p31-43 y DMSO (vehículo), siendo el número de células muertas similar al encontrado en los ratones tratados con la combinación PBS/ inhibidor de caspasa-1 o el lote control del experimento, tratado con PBS y DMSO (Figura 24.A-B).



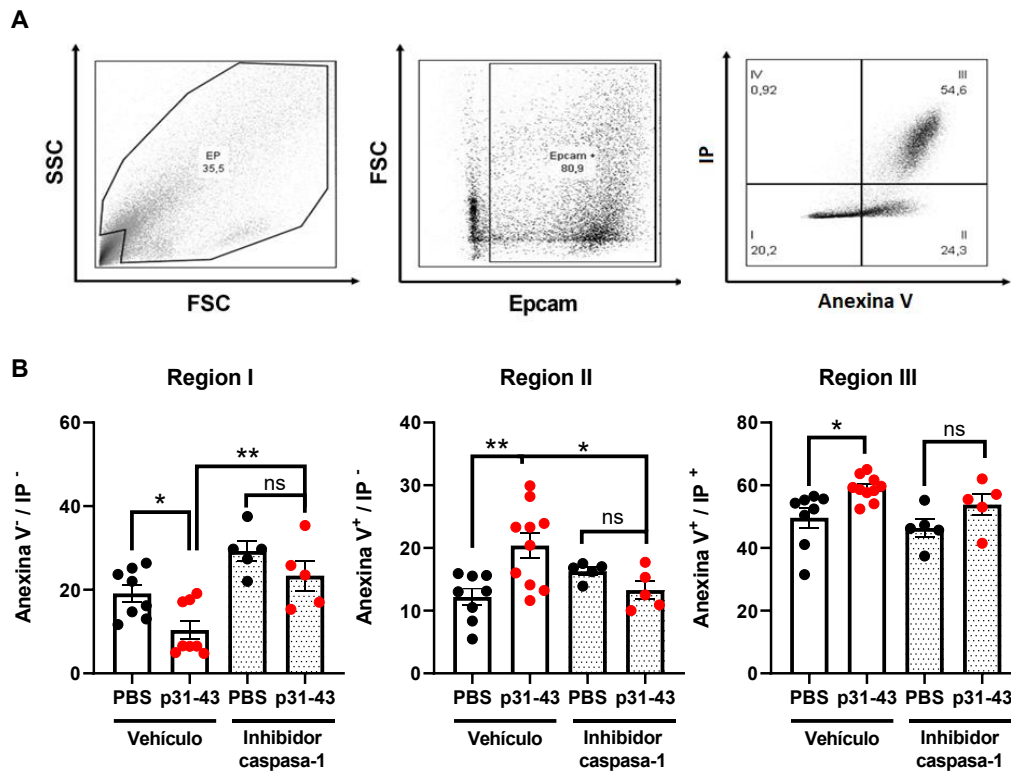
**Figura 24. Disminución de la muerte celular en el intestino delgado proximal en ratones tratados con inhibidor de caspasa -1 previo a la administración de p31-43**

**A.** Imágenes representativas de la reacción de TUNEL en intestino delgado proximal de ratones C57BL / 6 Arriba: Animales que recibieron vehículo (DMSO) 30min antes de la administración intragástrica de PBS o 20 µg de p31-43 Abajo: Animales tratados con inhibidor de caspasa-1, Ac-YVAD-cmk, 30min antes de la administración intragástrica de PBS o p31-43. Tinción DAPI para núcleos (azul). Células TUNEL<sup>+</sup> (verde). Ambos lotes sacrificados 16hS después de la administración intragástrica. **B.** Recuento de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propia del intestino delgado de ratones C57BL/6. Los datos se expresan como el número de células TUNEL<sup>+</sup> por µm<sup>2</sup> de lamina propia ± 1 SEM. PBS (n = 5), p31-43(n = 6), PBS + inhibidor (n= 5), p31-43 + inhibidor (n = 6). \*\*\*\* p <0,0001; ANOVA.

A su vez, de los animales tratados, se obtuvieron los intestinos delgados de los que se aislaron las células del compartimiento epitelial. Para el análisis de la muerte celular por citometría de flujo, se realizó un estudio similar al ya comentado en el *Capítulo 1 Sección 3.2*. Las células epiteliales se identificaron con el marcador EpCAM y la muerte celular se evaluó mediante marcación con yoduro de propidio (IP) y Anexina V.

En la **Figura 25**, se observa que las células EpCAM<sup>+</sup> de ratones tratados con p31-43/DMSO, en comparación con las del grupo que recibió una combinación PBS/DMSO, presentaron un aumento en las proporciones de células tanto de Anexina V<sup>+</sup> / IP<sup>Neg</sup> (etapa temprana en el proceso de muerte celular) (Región II), como de Anexina V<sup>+</sup> / IP<sup>+</sup> (etapa tardía del proceso de muerte celular) (Región III). Estos resultados indican que el tratamiento con p31-43 induce muerte celular en enterocitos, tal como se evidenció en el *Capítulo 1 Sección 3.2*.

Por otro lado, los animales tratados con p31-43 que recibieron además el inhibidor de caspasa-1 no mostraron aumento en la tasa de muerte de enterocitos. Estos resultados sugieren que se requiere caspasa-1 funcional para la inducción de muerte por p31-43, y que la piroptosis sería uno de los mecanismos de muerte celular programada operando en este sistema.



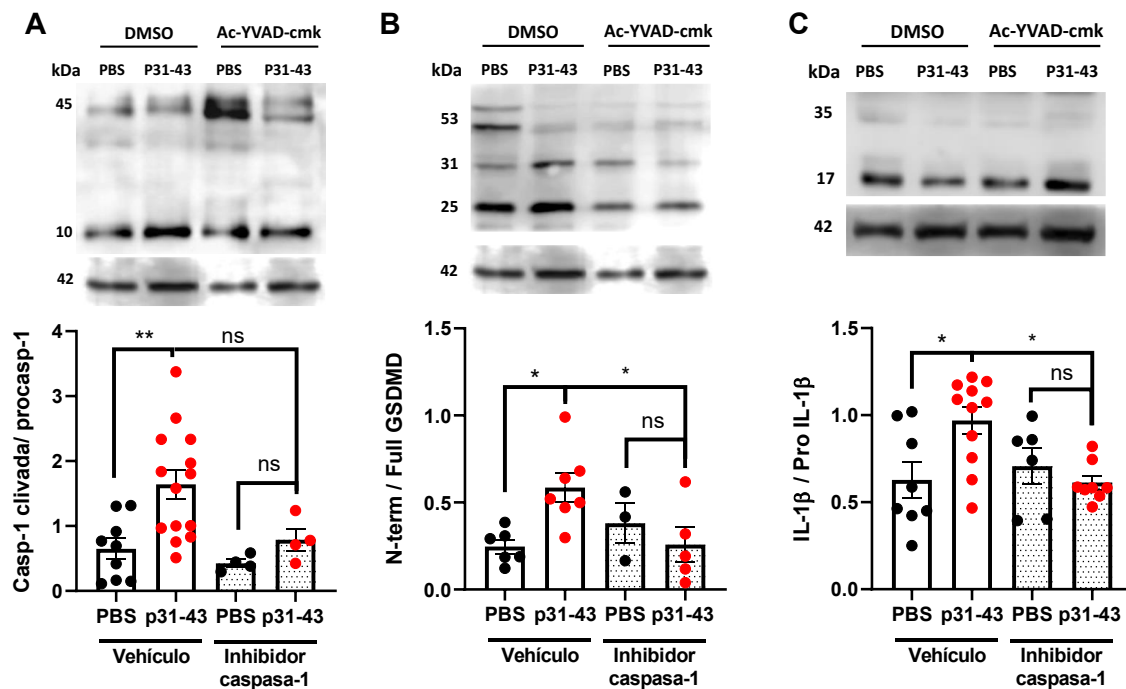
**Figura 25. Efecto de la inhibición de caspasa-1 en la muerte células epiteliales intestinales de animales tratados con p31-43**

Análisis por citometría de flujo de la fracción epitelial de secciones del intestino delgado de ratones C57BL/6 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de p31-43. Los animales se trataron con el inhibidor de caspasa-1, Ac-YVAD-cmk o con su vehículo (DMSO), 30min antes de la administración de p31-43 o PBS. Las células epiteliales se identificaron como células EpCAM+, analizándose la muerte celular mediante marcación con IP y Anexina V. **A.** Estrategia de gating. **B.** Porcentajes de células vivas (Anexina V<sup>Neg</sup> / IP<sup>Neg</sup>) **C.** etapas tempranas del proceso de muerte (Anexina V<sup>+</sup> / IP<sup>Neg</sup>) **D.** células muertas (Anexina V<sup>+</sup> / IP<sup>+</sup>) entre las células positivas de EPCAM en ratones que recibieron PBS o p31-43 y tratado con inhibidor o vehículo de caspasa-1. \* $p < 0,05$ ; ANOVA.

Con el fin de continuar con la caracterización de la activación del inflammasoma, realizamos ensayos cuantitativos mediante western blot, de proteínas claves en la vía de muerte celular, a partir de aislados de epitelio de ratones tratados con una combinación de inhibidor de caspasa-1 / PBS o p31-43. Estas determinaciones se compararon a su vez con muestras provenientes de animales que recibieron solamente DMSO (vehículo) y PBS o p31-43.

El inhibidor de caspasa-1, Ac-YVAD-cmk, es un inhibidor funcional de la actividad enzimática, se une en forma irreversible al sitio activo y no interfiere con su clivaje. En el análisis por western blot de proteínas extraídas del epitelio, no se encontraron diferencias significativas, aunque sí una tendencia a la disminución, en la relación caspasa-1 clivada: procaspasa-1 entre los ratones tratados con DMSO/ p31-43 y aquellos que recibieron inhibidor/p31-43. Dado que el inhibidor se une al sitio activo de la enzima y bloquea su actividad, es posible que el clivaje de procaspasa-1 a la forma madura se realice de manera similar a la situación en ausencia del inhibidor. Además, los ratones que recibieron la combinación inhibidor/ PBS no mostraron una diferencia significativa en comparación con los que recibieron DMSO/PBS, demostrando que la administración de Ac-YVAD-cmk no afecta la proporción de caspasa-1 (**Figura 26.A**).

Siguiendo un análisis similar, se observó una disminución significativa de la expresión de componentes clave de la piroptosis, GSDMD (**Figura 26.C**) e IL-1 $\beta$  (**Figura 26.D**), en los ratones tratados con una combinación de inhibidor/ p31-43 respecto de los que recibieron vehículo/ p31-43. La expresión de las versiones activas de estas moléculas determinadas como una relación respecto a su precursor, en los ratones que recibieron el inhibidor de caspasa-1 y p31-43 o PBS, alcanzó niveles muy similares a los observados en ratones que representan al grupo control del ensayo, quienes recibieron el vehículo y PBS.



**Figura 26. Efecto de la inhibición de caspasa-1 en la activación del inflammasoma inducida por p31-43**

A. Arriba: imágenes representativas de western blot. Abajo: Análisis cuantitativo de la activación de caspasa-1 expresada como la relación de caspasa-1 clivada: Procaspasa-1 en epitelio de ratones tratados con inhibidor de caspasa-1, o con vehículo (DMSO), y p31-43 ( $n = 4$ ) o PBS ( $n = 4$ ). B. Arriba: imágenes representativas de western blot. Abajo: Análisis

cuantitativo de la activación de GSDMD expresada como la relación de N-terminal: GSDMD en epitelio de ratones tratados con inhibidor de caspasa-1 o vehículo (DMSO) y p31-43 ( $n = 3$ ) o PBS ( $n = 5$ ). C. Arriba: imágenes representativas de western blot. Abajo: Análisis cuantitativo de la activación de IL-1 $\beta$  expresada como la relación de IL-1 $\beta$ : Pro IL-1 $\beta$  en epitelio de ratones tratados con inhibidor de caspasa-1 o vehículo (DMSO) y p31-43 ( $n = 6$ ) o PBS ( $n = 6$ ).  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student para datos no apareados.

### **2.2.2 La inhibición de NLRP3 no previene la muerte de células epiteliales inducida por p31-43 in vivo**

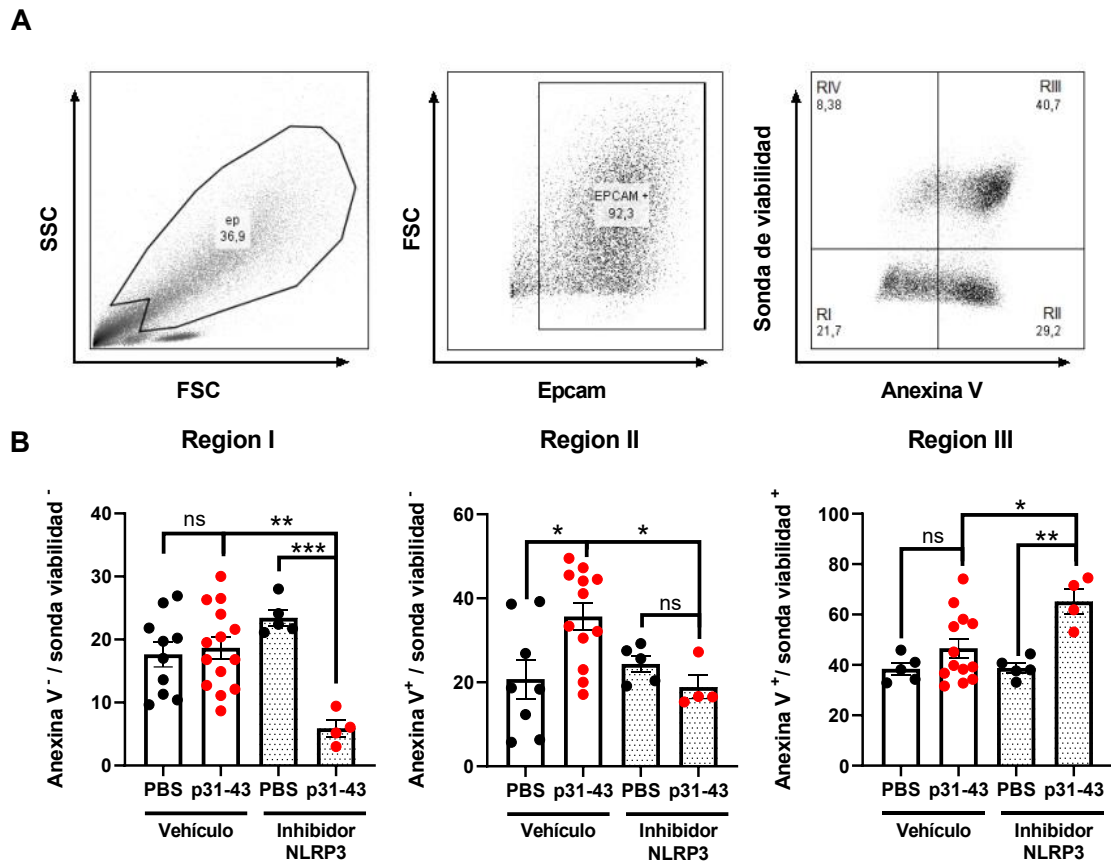
Como hemos mencionado, el p31-43 ejerce efectos biológicos *in vivo* a tiempos muy cortos luego de su administración. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, hasta la fecha no se ha identificado un receptor para este péptido (Paolella et al., 2018) y tampoco han sido caracterizados los mecanismos de pasaje del péptido a través de la membrana celular.

Considerando los hallazgos de nuestro grupo, que sugieren que el péptido de gliadina p31-43 forma oligómeros (Herrera et al., 2019) y que el inflammasoma NLRP3 además de expresarse en el intestino delgado es un sensor de estructuras morfológicamente diversas como asbestos, silica, o señales de daño de vesículas, RE o mitocondrias (Swanson et al., 2019) sea en forma directa o bien como una señal derivada del daño celular (Zmora et al., 2017), sumado a las evidencias de que la piroptosis podría estar involucrada en el mecanismo de daño, ya que demostramos la participación de caspasa-1 en el proceso, decidimos estudiar si p31-43 podría inducir piroptosis a través de la activación del inflammasoma NLRP3. Con este fin evaluamos la posible modificación de la inducción de muerte celular en el epitelio intestinal cuando se bloquea NLRP3 *in vivo* con el inhibidor MCC950.

De los distintos grupos de animales tratados, se obtuvieron los intestinos delgados de los que se aislaron las células del compartimiento epitelial. Para el análisis de la muerte celular por citometría de flujo las células epiteliales, al igual que como se estudió con el inhibidor de caspasa-1, se identificaron con el marcador EpCAM y la muerte celular se evaluó con Anexina V y, en este caso, sonda de viabilidad.

Aquí se observó que las células EpCAM<sup>+</sup> de ratones tratados con p31-43 combinado con el inhibidor MCC950, en comparación con las del grupo con PBS e inhibidor, presentaron una disminución en la proporción de células Anexina V<sup>+</sup> / sonda de viabilidad<sup>Neg</sup> (etapa temprana en el proceso de muerte celular) (Región II), tal como se había observado en el caso del inhibidor de caspasa-1. En cuanto a las células Anexina V<sup>+</sup> / sonda de viabilidad<sup>+</sup> (etapa tardía del proceso de muerte celular) (Región III) pudimos observar que el número es mayor con la combinación p31-43/inhibidor que cuando se utiliza el inhibidor/PBS concordando con lo observado en la región I (Anexina V<sup>Neg</sup> / sonda de viabilidad<sup>Neg</sup>) que muestra una clara disminución de las células vivas cuando se administra el péptido p31-43 y el inhibidor MCC950.

Estos hallazgos indican que el tratamiento con p31-43 e inhibidor de NLRP3, induce muerte celular en enterocitos a diferencia de lo observado con el inhibidor de caspasa-1, donde la tasa de muerte de enterocitos se encuentra disminuida. De todas maneras, cabe destacar que, si nos centramos en la proporción de células vivas, se aprecia que es realmente baja en los ratones con una combinación péptido/ inhibidor en comparación con los otros grupos, sugiriendo que el bloqueo de NLRP3 puede tener consecuencias negativas en la homeostasis de la mucosa, a pesar de que en la bibliografía no se reporten comportamientos similares al utilizar MCC950 (Figura 27).



**Figura 27. Papel de NLRP3 en la inducción de muerte celular por p31-43**

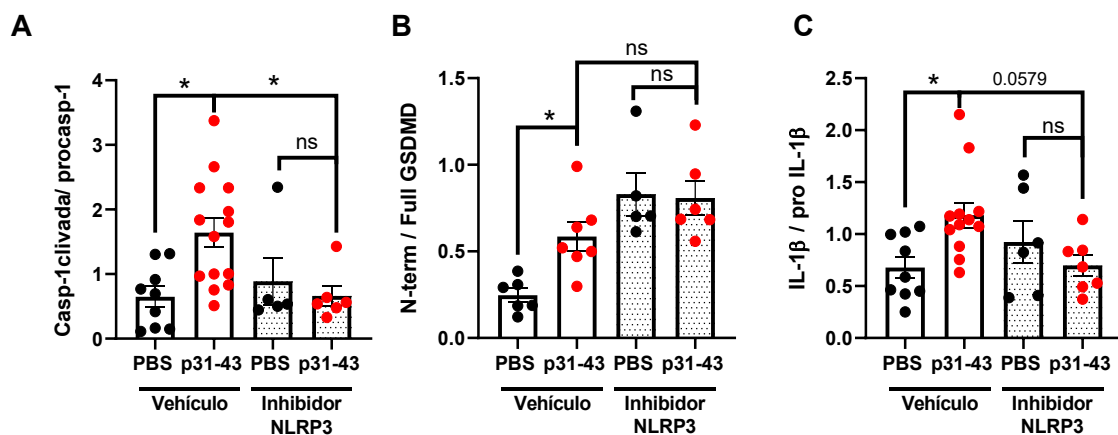
Análisis de citometría de flujo de la fracción epitelial de secciones del intestino delgado de ratones C57BL / 6 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de p31-43. Los animales se trataron con el inhibidor de NLRP3, MCC950, o vehículo (DMSO), 30min antes de la administración de p31-43. Las células epiteliales se identificaron como células EpCAM<sup>+</sup>, analizándose la muerte celular mediante marcación con Anexina V y sonda de viabilidad. **A.** Porcentajes de células vivas (Anexina V<sup>neg</sup> / sonda de viabilidad<sup>neg</sup>) **B.** etapas tempranas del proceso de muerte (Anexina V<sup>+</sup> / sonda de viabilidad<sup>neg</sup>) **C.** células muertas (Anexina V<sup>+</sup> / sonda de viabilidad<sup>+</sup>) entre las células EpCAM<sup>+</sup> en ratones que recibieron PBS o p31-43, inhibidor NLRP3 o vehículo. \* $p < 0,05$ ; ANOVA.

Mediante la técnica de western blot, estudiamos la activación de proteínas claves en la vía de muerte celular por piroptosis a partir de aislados de epitelio de ratones tratados con una combinación de inhibidor de NLRP3 (MCC950) y PBS o p31-43. Estas determinaciones se compararon a su vez, con muestras provenientes de animales que solo recibieron PBS o p31-43 y vehículo (DMSO).

Evidenciamos que cuando se administra el inhibidor de NLRP3 y p31-43, la relación caspasa-1 clivada: procaspasa-1 en la región epitelial es estadísticamente menor con respecto a quienes solo fueron tratados con p31-43 y vehículo. Esos ratones, a su vez, no mostraron una diferencia significativa en comparación con los que recibieron inhibidor/PBS, por lo que se demostró que MCC950 fue capaz de inhibir la activación de caspasa-1 inducida por p31-43. Finalmente, al comparar los ratones que recibieron PBS y vehículo o la combinación inhibidor/PBS observamos que no existen diferencias significativas entre grupos, mostrando que por sí solo MCC950 no genera un efecto en la activación de la caspasa-1 (**Figura 28.A**).

A diferencia de lo observado con caspasa-1, al estudiar la activación de componentes como GSDMD o IL-1 $\beta$  en los ratones que recibieron una combinación de inhibidor /p31-43 no documentamos una disminución significativa de su activación. De hecho, en el caso de GSDMD si comparamos los valores encontrados en ratones control del ensayo, que recibieron PBS y vehículo, con los tratados con inhibidor/PBS observamos que son significativamente mayores. Estos hallazgos sugieren que la activación de GSDMD no depende únicamente de NLRP3, si no que podrían participar vías alternativas que contribuyan al clivaje de GSDMD (**Figura 28.B- C**).

Demostramos entonces que la inhibición del inflammasoma NLRP3 aguas arriba de la activación de la caspasa-1, GSDMD e IL-1 $\beta$  genera efectos en la activación de la vía. Por un lado, influye en la activación de caspasa-1 disminuyéndola, pero no afecta significativamente la activación de GSDMD e IL-1 $\beta$ , moléculas que como ya hemos comentado pueden ser activadas por distintas señales. Estos hallazgos coinciden con el aumento de la muerte celular documentado mediante citometría de flujo.





**Figura 28. Modificación de la expresión de mediadores de muerte celular por piroptosis en ratones tratados con inhibidor de NLRP3**

**A.** Análisis cuantitativo de la activación de caspasa-1 expresada como la relación de caspasa-1 clivada: procaspasa-1 en epitelio de ratones tratados con inhibidor de NLRP3 o vehículo (DMSO) y p31-43 ( $n = 5$ ) o PBS ( $n = 6$ ).  $*p < 0,05$ ; ns; Prueba t de Student para datos no apareados. **B.** Análisis cuantitativo de la activación de GSDMD expresada como la relación de N-terminal: GSDMD en epitelio de ratones tratados con inhibidor de NLRP3 o vehículo (DMSO) y p31-43 ( $n = 5$ ) o PBS ( $n = 5$ ). ns; Prueba t de Student para datos no apareados. **C.** Análisis cuantitativo de la activación de IL-1 $\beta$  expresada como la relación de IL-1 $\beta$ : Pro IL-1 $\beta$  en epitelio de ratones tratados con inhibidor de NLRP3 o vehículo (DMSO) y p31-43 ( $n = 6$ ) o PBS ( $n = 6$ ). ns; Prueba t de Student para datos no apareados.

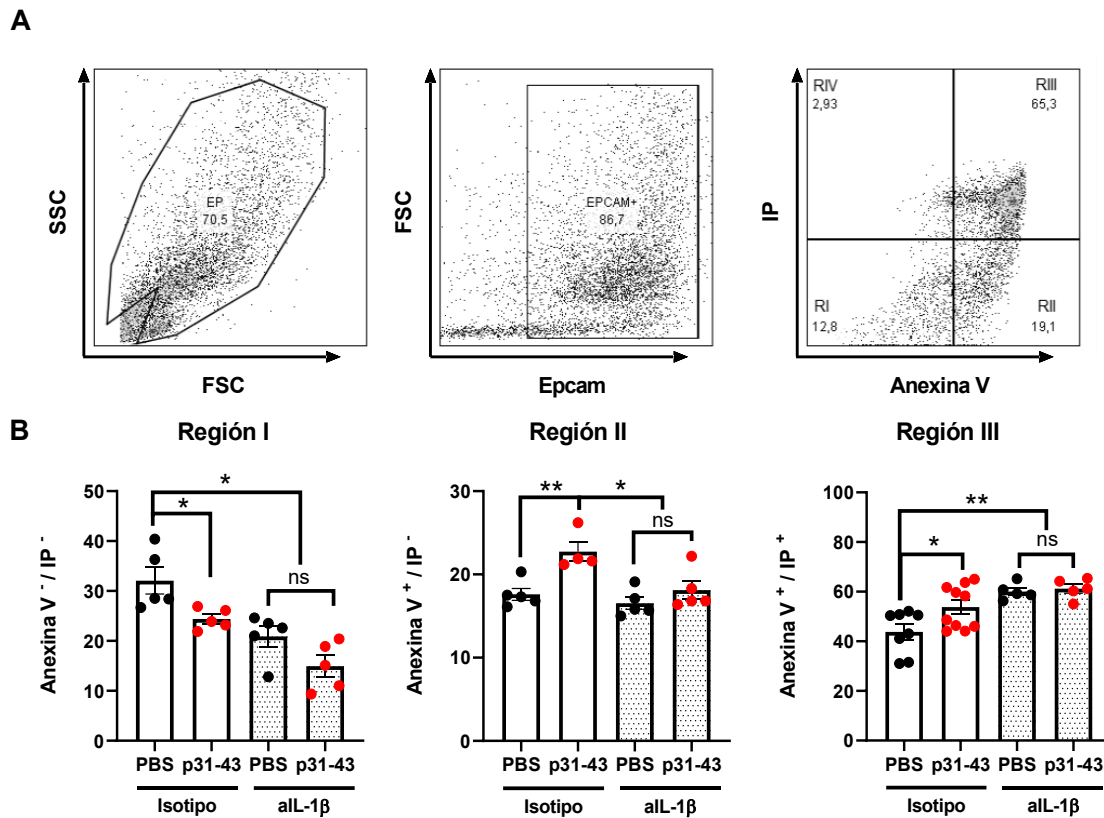
**2.2.3 La inhibición de IL-1 $\beta$  previene la muerte de células epiteliales inducida por p31-43 in vivo**

Para finalizar con nuestra caracterización optamos por utilizar, en un ensayo *in vivo*, un anticuerpo bloqueante funcional de IL-1 $\beta$ . Este anticuerpo y su control isotipo fueron provistos por la Empresa Novartis.

De los animales tratados por vía intraperitoneal con el anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y su control isotipo, y luego por vía intragástrica con p31-43 o PBS, se obtuvieron los intestinos delgados de los que se aislaron las células del compartimiento epitelial. Para el análisis de la muerte celular por citometría de flujo las células epiteliales, al igual que en procedimientos anteriores, se identificaron con el marcador EpCAM y la muerte celular se evaluó con Anexina V y el uso de IP.

Las células EpCAM<sup>+</sup> de ratones tratados con el anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y luego con p31-43, no mostraron diferencias significativas con respecto a las provenientes de ratones tratados con el anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y PBS en las tres regiones analizadas. Esto sugeriría que la administración del anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  fue capaz de bloquear la inducción de muerte producida por p31-43.

Cabe destacar que, aunque el número de células vivas tanto en los ratones tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y p31-43 como con anticuerpo y PBS no mostró diferencias significativas en la Región I (Anexina V<sup>Neg</sup> / IP<sup>Neg</sup>), encontramos una clara disminución de las células vivas cuando se comparan las células provenientes de ratones control del ensayo que recibieron control de isotipo y PBS. De esta forma, a pesar de disminuir la tasa de muerte celular de los enterocitos al incorporar el anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ , ésta no llega a igualarse a la de los ratones control, por lo que la simple inhibición de IL-1 $\beta$  no sería suficiente para la reversión del daño provocado (**Figura 29**).



**Figura 29. Papel de IL-16 en la inducción de muerte celular por p31-43**

Análisis de citometría de flujo de la fracción epitelial de secciones del intestino delgado de ratones C57BL/6 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de p31-43. Los animales se trataron con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y su control isotipo, 60 min antes de la administración de p31-43. Las células epiteliales se identificaron como células EpCAM<sup>+</sup>, analizándose la muerte celular mediante marcación con IP y Anexina V **A**. Porcentajes de células vivas (Anexina V<sup>Neg</sup> / IP<sup>Neg</sup>) **B**. etapas tempranas del proceso de muerte (Anexina V<sup>+</sup> / IP<sup>Neg</sup>) **C**. células muertas (Anexina V<sup>+</sup> / IP<sup>+</sup>) entre las células positivas de EPCAM en ratones que recibieron PBS o p31-43, anticuerpo o vehículo de IL-1 $\beta$ . \* $p < 0,05$  se consideraron significativos; ANOVA

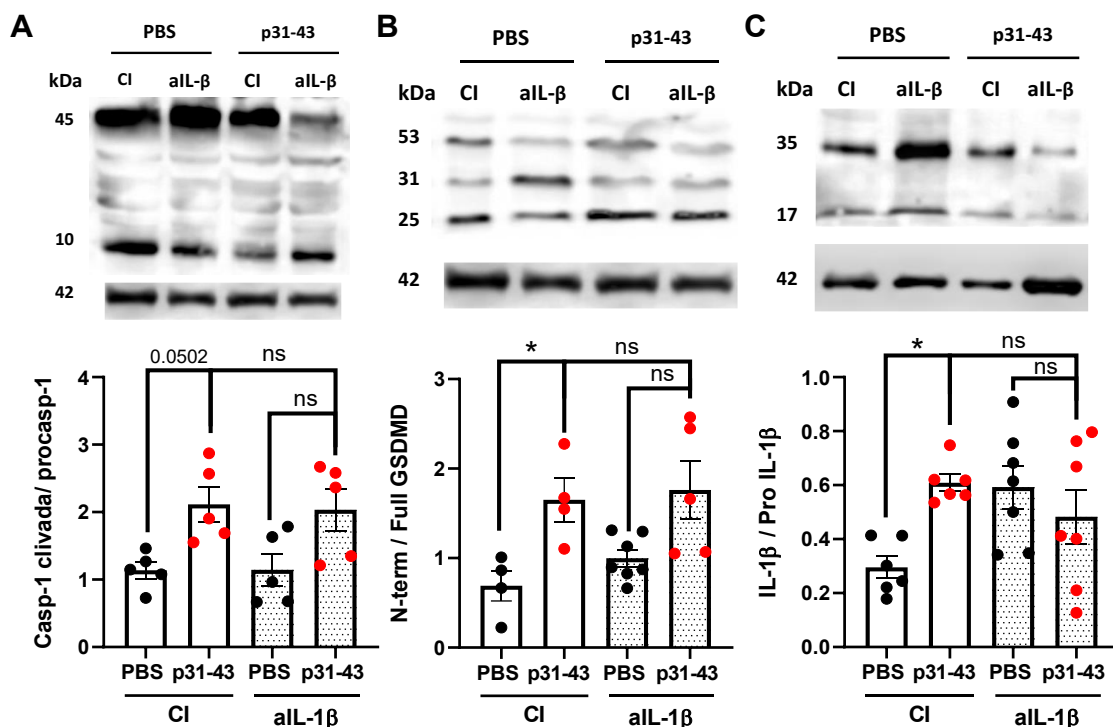
A continuación, mediante la técnica de western blot, estudiamos la activación de proteínas claves en la vía a partir de aislados de epitelio de ratones tratados con una combinación anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y PBS o p31-43. Estas determinaciones se compararon a su vez con muestras provenientes de animales que solo recibieron PBS o p31-43 y control de isotipo.

Evidenciamos que cuando se administra una combinación de anticuerpo y p31-43 la relación caspasa-1 clivada: procaspasa-1 en la región epitelial no registra diferencias significativas respecto a quienes solo fueron tratados con p31-43 y control de isotipo. Esos ratones, a su vez, no mostraron una diferencia significativa en comparación con los que recibieron anticuerpo /PBS. Al comparar los ratones que recibieron solo PBS o una combinación anticuerpo/PBS observamos que no existen diferencias significativas entre

grupos. De esta forma, se demostró que el agregado por sí solo del anticuerpo no genera un efecto en la activación de la caspasa-1 (Figura 30.A).

Al estudiar la activación de componentes como GSDMD o la propia IL-1 $\beta$ , en los ratones que recibieron una combinación de anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ /p31-43 no documentamos una disminución significativa de su activación. De hecho, en el caso de GSDMD, si comparamos los valores encontrados en ratones que solo recibieron p31-43 y control de isotipo con los tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ /p31-43, podemos observar que en estos últimos la expresión de los fragmentos N-terminales de GSDMD son significativamente mayores. Es así, que el agregado del anticuerpo genera un efecto en la activación de GSDMD por sí solo que no depende únicamente del agregado de p31-43, pudiendo deberse dicho incremento a la activación de vías alternativas que pueden influir en el clivaje de GSDMD (Figura 30.C-D).

Es importante destacar que no se observa un mecanismo de retroalimentación de la IL-1 $\beta$  en la activación de la vía, puesto que los niveles de caspasa-1, GSDMD y la propia IL-1 $\beta$  activada se encuentran elevados durante la inhibición con el anticuerpo en los ratones que también reciben p31-43. Sin embargo, podría influir en el daño a la mucosa intestinal en el modelo, donde se observó disminución de la tasa de muerte de los enterocitos y reversión del daño histológico registrado en los ratones mediante mediciones de relación V/C y el recuento de IELs/100 a partir de imágenes de hematoxilina-eosina.

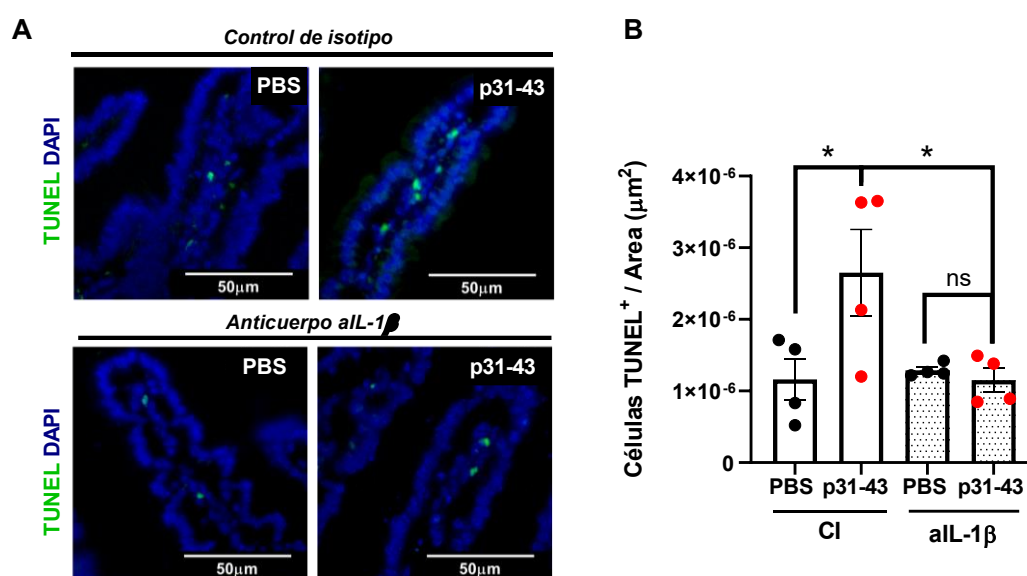


**Figura 30. Modificación de la expresión de marcadores de muerte celular por piroptosis en ratones tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$**

A. Arriba: imágenes representativas de western blot. Abajo: Análisis cuantitativo de la activación de caspasa-1 expresada como la relación de caspasa-1 clivada: procaspasa-1 en

epitelio de ratones tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  o el control isotipo (CI) y p31-43 (n =5) o PBS (n =5). ns; Prueba t de Student para datos no apareados. **B. Arriba:** imágenes representativas de western blot. **Abajo:** Análisis cuantitativo de la activación de GSDMD expresada como la relación de N-terminal: GSDMD en epitelio de ratones tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  o el control isotipo y p31-43 (n =5) o PBS (n =7). \*p <0,05 se consideraron significativos; Prueba t de Student para datos no apareados. **C. Arriba:** imágenes representativas de western blot. **Abajo:** Análisis cuantitativo de la activación de IL-1 $\beta$  expresada como la relación de IL-1 $\beta$ : Pro IL-1 $\beta$  en epitelio de ratones tratados con anticuerpo anti-IL1 $\beta$  o el control isotipo y p31-43 (n =4) o PBS (n = 4). \*p <0,05 se consideraron significativos; Prueba t de Student para datos no apareados.

Con el fin de terminar de caracterizar el rol de IL-1 $\beta$  en nuestro modelo de enteropatía y dar contexto a los resultados obtenidos con la utilización del anticuerpo inhibidor, se empleó la reacción de TUNEL para determinar el número de células muertas en el tejido. Mediante esta técnica se observó una disminución significativa del número de células TUNEL<sup>+</sup> en lamina propria de los ratones tratados con el anticuerpo y el péptido cuando se compara con el lote que solo recibió p31-43 y control de isotipo, siendo el número de células muertas similar al encontrado en los ratones tratados solamente con PBS o con la combinación PBS/ anticuerpo (Figura 31.A-B).

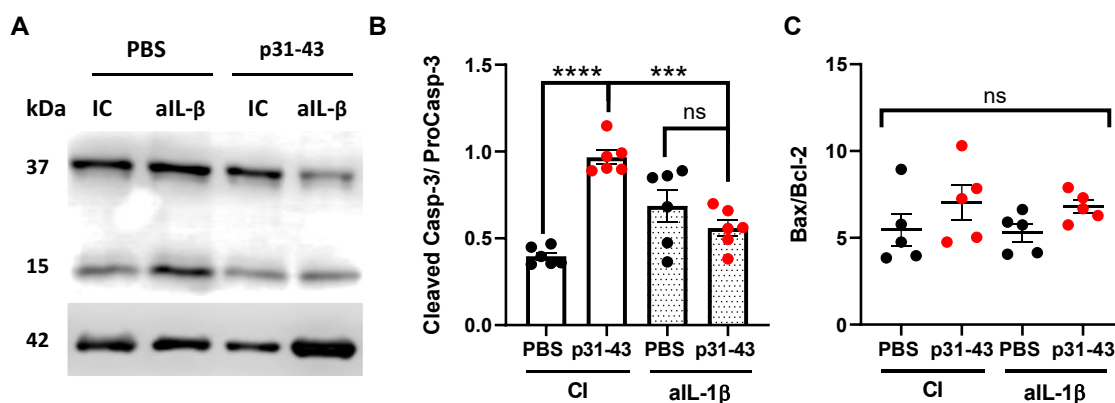


**Figura 31. Disminución de la muerte celular en el intestino delgado proximal después del tratamiento con un anticuerpo inhibidor de IL-1 $\beta$  y p31-43**

**A.** Imágenes representativas de TUNEL del intestino delgado proximal de ratones C57BL / 6 **Arriba:** 16hs después de la administración intragástrica de PBS o 20  $\mu$ g de p31-43, ambos tratados con el control de isotipo (CI). **Abajo:** Animales tratados con anticuerpo inhibidor de IL-1 $\beta$ , 60 minutos antes de la administración intragástrica de PBS o p31-43, sacrificados 16hs post estímulo. Tinción DAPI para núcleos (azul). Células TUNEL<sup>+</sup> (verde). **B.** Recuento de células TUNEL<sup>+</sup> en la lamina propria del intestino delgado de ratones C57BL/6. Los datos se expresan como el número de células TUNEL<sup>+</sup> por  $\mu$ m<sup>2</sup> de lamina propria  $\pm$  1 SEM. PBS (n = 4), p31-43(n = 4), PBS + inhibidor (n = 4), p31-43 + inhibidor (n = 4). \*p <0,05; ANOVA.

Este resultado nos lleva a plantearnos la posibilidad de que la IL-1 $\beta$  posea alguna función sobre otros mediadores clave de vías de muerte celular alternativas como lo es la apoptosis, que ya hemos demostrado en el capítulo anterior se encuentra sobre-activada tanto en nuestro modelo como en la patogenia de la EC. Para ello, decidimos estudiar al principal efector de la vía, la caspasa-3, en los tejidos que han recibido el anticuerpo inhibidor o el control de isotipo. En forma llamativa, se observó una disminución significativa en la relación caspasa-3/ procaspasa-3 en comparación con los ratones tratados solamente con p31-43, reforzando nuestra hipótesis de que existe una estrecha relación y corregulación entre las distintas vías de muerte celular (Figura 32.A-B).

Con el fin de profundizar en la caracterización de la vía de muerte celular por apoptosis, se analizó por qPCR la expresión de genes anti- y pro-apoptóticos, Bcl-2 y Bax, respectivamente. Aunque en el *Capítulo 1 Sección 3.2* demostramos que el incremento en la relación Bax/Bcl2 en intestino delgado de ratones post estimulación con p31-43 se reflejaba a las 4hs, solo se contaba con muestras tomadas a las 16hs post estimulación para el análisis y ante la imposibilidad de repetir el ensayo se decidió proceder a la determinación de todas maneras, sabiendo que no nos encontrábamos en el tiempo adecuado para la medición. Teniendo dicha premisa en cuenta, no encontramos diferencias entre los grupos estudiados a las 16hs post tratamiento (Figura 32.C).



**Figura 32. Modificación de la expresión de mediadores de la vía apoptótica, en ratones tratados con anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y p31-43**

**A.** imágenes representativas de western blot. **B.** Análisis cuantitativo de la activación de caspasa-3 expresada como la relación de caspasa-3 clivada: procaspasa-3 en epitelio de ratones tratados con anticuerpo anti-IL1 $\beta$  (60 min) o control de isotipo (CI) antes de la administración de p31-43 (n =6) o PBS (n =6). \*\*\* p <0,001, \*\*\*\* p <0,0001; Prueba t de Student para datos no apareados. **C.** Estudios de expresión a nivel de ARNm de Bax y Bcl-2 como cociente pro-apoptótico (expresión relativa Bax/Bcl-2) por PCR cuantitativa en extractos de intestino delgado de ratones tratados con anticuerpo anti-IL1 $\beta$  (60 min) o control de isotipo (CI) antes de la administración de p31-43 (n =5) o PBS (n =5), el sacrificio se efectuó 16hs después de la administración. Unidades relativas (UR).

## Discusión

Si bien hemos demostrado la implicancia de la apoptosis en la muerte celular en la mucosa intestinal en la patogenia de EC, no debe pasarse por alto que existen otros tipos de muerte celular que pueden estar operando en el tejido y que han sido relacionadas a distintas patologías, algunas asociadas al intestino (Tang et al., 2021; Yuan et al., 2018).

Con esa premisa en mente y habiendo demostrado, mediante la técnica de TUNEL, que existe una gran cantidad de células en *lamina propria* que están sufriendo procesos de muerte celular, sumado a que se ha documentado que los niveles séricos de IL-1 $\beta$  disminuyen en pacientes con EC después de 1 año con dieta libre de gluten (Manavalan et al. 2010), es posible sugerir una activación del inflammasoma con consecuente disparo de vías, como la piroptosis, inducidas por gliadinas en intestino delgado de pacientes celíacos.

Se corroboró la implicancia de distintos inflammasomas importantes a nivel del intestino delgado, los cuales se encuentran sobre-expresados en otras patologías relacionadas como la Enfermedad de Crohn (Zhang et al., 2021). Observamos que tanto NLRP3, sensor activado por un gran espectro de estímulos aparentemente no relacionados que se asocian con el flujo de K<sup>+</sup>, como AIM2, sensor de ADN citosólico, están sobre-expresados en la mucosa duodenal de pacientes celíacos y podrían desempeñar un papel fundamental en la cascada de activación de la piroptosis.

Siguiendo la misma línea, los estudios por microscopía de fluorescencia y western blot mostraron un aumento de la forma activa de caspasa-1, así como de GSDMD, en muestras duodenales de los pacientes celíacos respecto a muestras provenientes de la población control. Debe recordarse que GSDMD, puede activarse también por acción de la caspasa-8, un componente iniciador de la vía de la apoptosis que hemos demostrado se encuentra sobre-activado en el *Capítulo 1 Sección 2*.

Como ya hemos mencionado, la piroptosis culmina con la liberación de factores inflamatorios (IL-1 $\beta$ , IL-18 y alarminas). Hemos demostrado un aumento en la liberación de IL-1 $\beta$  en pacientes con EC mediante imágenes de inmunofluorescencia indirecta y también por western blot, que es consistente con la activación de la piroptosis y con el hallazgo de niveles séricos elevados de esta citoquina en la patología (Manavalan et al., 2010). De la mano de estas observaciones, recientemente, nuestro equipo de trabajo ha documentado un incremento en la liberación de alaminas como IL-33, HMGB1 y proponemos que la piroptosis puede ser el mecanismo responsable de liberar estas moléculas de forma activa al ambiente extracelular (Manti et al., 2017; Perez et al., 2020, 2021).

Llamativamente, también hemos observado que la vía no canónica de la piroptosis, que depende de la activación de caspasa-4/5 (Tang et al., 2019), podría ser funcional en el duodeno de pacientes celíacos, dado el aumento en la expresión de la forma activa de

caspasa-4. Los mecanismos que gatillan esta activación se asocian a infecciones por bacterias con LPS en su superficie. En el caso de EC, una posible interpretación sería considerar que al verse afectadas las uniones estrechas entre los enterocitos y por consiguiente existir un aumento de permeabilidad, se permitiría el ingreso de LPS, para su posterior endocitosis (Vancamelbeke & Vermeire, 2017). En relación con esto último, HMGB1, alarmina que es liberada en mayor concentración en suero y heces de pacientes con EC (Manti et al., 2017), puede promover la activación de la piroptosis mediante la liberación de LPS en el citosol induciendo la activación de las caspasa-4/5 (Cheung et al., 2017).

Si bien la activación del inflamasoma y la muerte celular inflamatoria son procesos críticos para la protección frente a patógenos, debe tenerse en cuenta que su activación excesiva puede potenciar la aparición de enfermedades inflamatorias o autoinmunidad, mediante la liberación descontrolada de señales de daño, hecho que podría asociarse a los fenómenos que ocurren en la mucosa duodenal de pacientes con EC.

En forma análoga, en nuestro modelo murino de enteropatía, observamos aumento de las formas activas de caspasa-1 y GSDMD cuando se analizaron en forma separada, mediante técnicas como inmunofluorescencia y western blot, células del compartimiento epitelial o de *lamina propria* de animales tratados con p31-43 comparado con ratones control. Por otro lado, solo la fracción epitelial de los ratones tratados con p31-43 mostró un incremento en IL-1 $\beta$  activa. Esto sugiere que, en distintos tipos celulares, diferentes formas de respuesta inflamatoria pueden provocar la muerte celular en estos compartimientos.

La falta de daño histológico y muerte celular en los animales tratados con el p31-43 en presencia de un inhibidor *in vivo* de caspasa-1, confirmó la importancia de esta caspasa en el proceso inflamatorio. A su vez, estos resultados son respaldados por estudios previos de nuestro equipo, donde ratones caspasa-1/11<sup>-/-</sup> no presentaron alteraciones histológicas al tratarlos con el p31-43 (Gómez Castro et al., 2019). En resumen, esto refuerza la idea de que la piroptosis también puede ser inducida en células epiteliales mediante un daño estéril resultante a la administración intragástrica del p31-43 (**Ilustración 19.A**).

En línea con nuestras observaciones, recientemente se ha descrito que en células epiteliales intestinales existen eventos esporádicos de muerte por piroptosis. En este mecanismo, la activación de caspasa-1 conduce a la muerte por piroptosis y extrusión celular, acompañada de una pérdida de la función de barrera por un cierre defectuoso del espacio liberado por la célula extruída. Sin embargo, se establecen señales (aun no determinadas) en las células vecinas, que inducen la extensión de prolongaciones que cubren el espacio generado y mantienen la integridad de la barrera epitelial. Este evento de cierre demora unos minutos y genera un aumento de permeabilidad transitoria. (Alexis Bonfim-Melo, 2022)

Habiendo demostrado la importancia de la caspasa-1 en el modelo, decidimos estudiar los fenómenos implicados en su activación aguas arriba. Como ya hemos mencionado, el

inflammasoma NLRP3 cobró suma importancia en nuestro estudio puesto que no solo abunda en el intestino delgado, sino que, al ser un sensor de estructuras morfológicamente diversas, sea en forma directa o bien como una señal derivada del daño celular (Zmora et al., 2017), podría estar respondiendo a la formación de oligómeros del péptido de gliadina p31-43 (Herrera et al., 2019).

Como parte de la caracterización del efecto *in vivo* de la inhibición de NLRP3, se observó que la administración de MCC950 previo al tratamiento con p31-43, previene el incremento en el número de IELs, pero no normaliza la relación V/C (Miculán E, trabajo de tesis en realización). Estos resultados sugieren que los fenómenos que ocurren en la mucosa responden a diferentes vías, probablemente porque las células o mediadores involucrados en cada mecanismo difieren (**Ilustración 19.B**).

En este sentido, la inhibición de NLRP3 no redujo la muerte de las células epiteliales, a pesar de que el bloqueo de caspasa-1 mostró una inhibición significativa de la muerte celular. Esto sugiere que tal vez otros inflammasomas estén involucrados en el desencadenamiento de la piroptosis en este modelo, como por ejemplo NLRC4, sensor de diversos ligandos bacterianos (Watanabe et al., 2021), NLRC6, inflammasoma asociado con el mantenimiento de la homeostasis del tracto gastrointestinal cuya desregulación resulta en disbiosis (Venuprasad & Theiss, 2021) o incluso AIM2, que ya hemos demostrado se encuentra sobre-expresado en enfermedad celíaca y además recientemente se ha publicado su importancia en el ensamblaje del PANoptosoma junto con ZBP1, el cual comprende múltiples sensores de inflammasoma y reguladores de muerte celular (S. J. Lee et al., 2021).

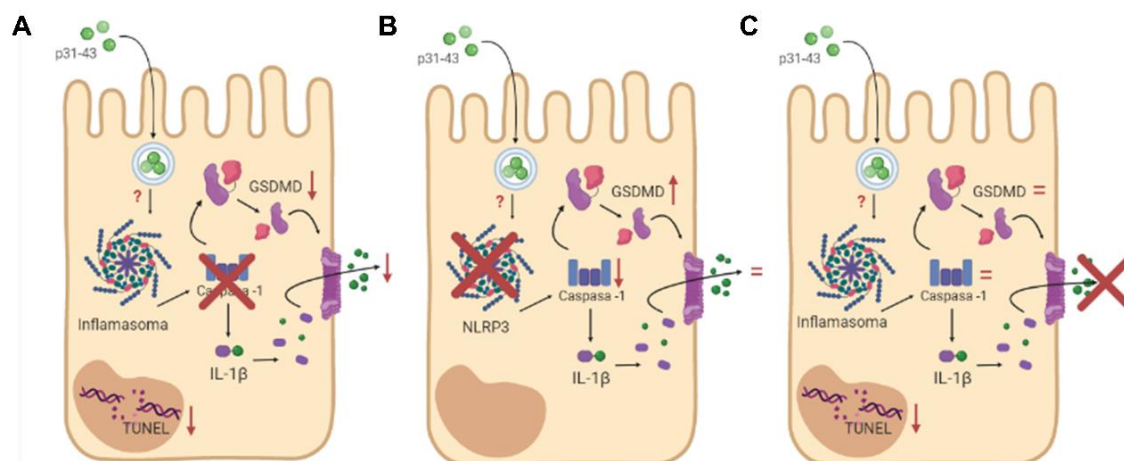
También, es llamativo que se incremente el número de células muertas en los ratones con el inhibidor respecto al tratamiento exclusivo con p31-43, sugiriendo que el bloqueo de la activación de esta plataforma desencadena otros mecanismos de muerte alternativos, que requieren estudios adicionales. Debe considerarse que todos estos estudios han sido realizados a nivel epitelial y debería evaluarse el aporte de la *lamina propria*. Proyecto que continúa en curso.

Finalmente, el bloqueo de IL-1 $\beta$  mediante el uso de un anticuerpo específico ocasionó una marcada disminución de la apoptosis en los animales tratados con el péptido. Con el objetivo de profundizar en este hallazgo, se evaluó la relación Bax/Bcl2. Debe recalarse que solo se disponía de muestras a las 16hs post estímulo para la medida de la expresión a nivel de ARNm, cuando sabemos que esta determinación debe realizarse a las 4hs (como evidenciamos en el *Capítulo 1 Sección 3.2*). Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas. De todas maneras, estos resultados son similares a los descritos por Friedlander RM et al., (1996) que mostraron que la IL-1 $\beta$  promueve la apoptosis, y que su bloqueo con un anticuerpo policlonal específico inhibió la muerte celular. Sin embargo, el bloqueo de IL-1 $\beta$  no evitó la persistente activación de la vía piroptótica, ni la muerte de enterocitos en respuesta al p31-43. Por ende, los resultados sugieren la posible participación no solo de otros inflammasomas, sino también de otros componentes liberados



por las células piroptóticas, los cuales podrían intervenir en el procesos de muerte en el epitelio inducidos por el p31-43. (Ilustración 19.C)

En conjunto, estos hallazgos refuerzan nuestra hipótesis de que existe una estrecha relación y correulación entre las distintas vías de muerte celular. De igual manera, que con el inhibidor de NLRP3, deben continuarse los estudios sobre la fracción correspondiente a la *lamina propria* para establecer una conclusión definitiva sobre el aporte de la IL-1 $\beta$  en los mecanismos de daño en la mucosa y en la muerte celular.

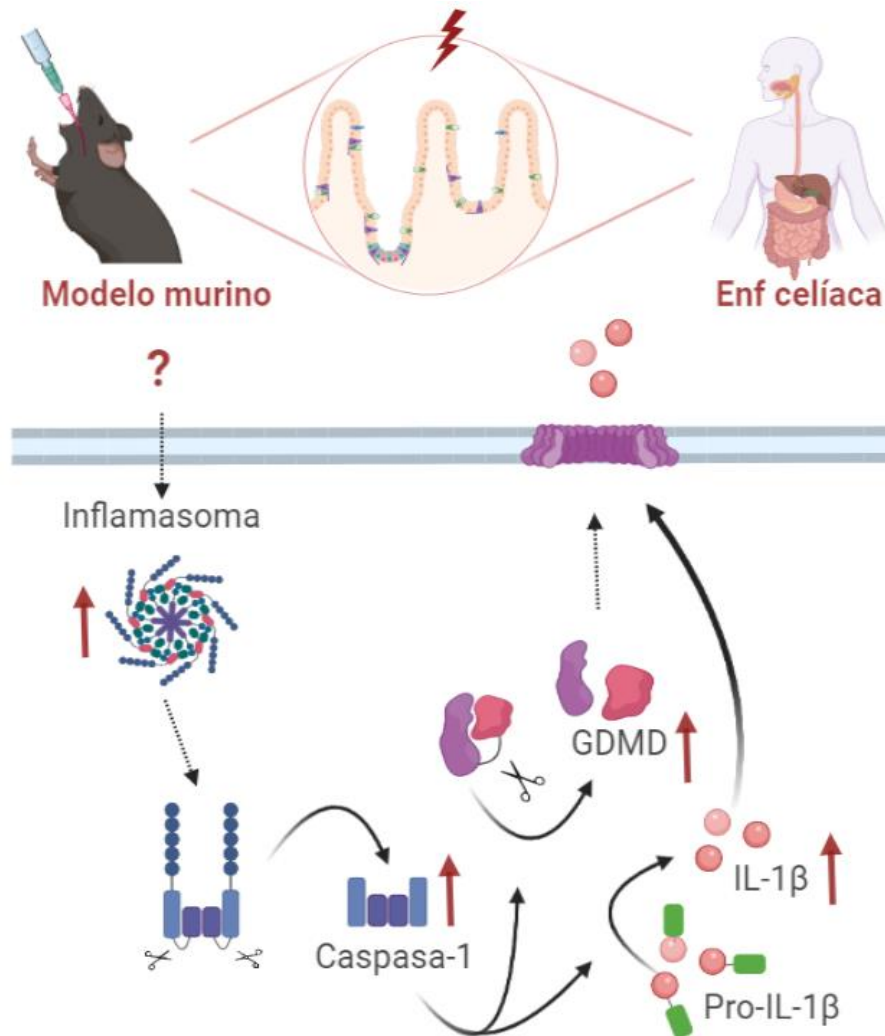


**Ilustración 19. Resumen de resultados del empleo de inhibidores de componentes claves de la vía piroptótica**

En la ilustración se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos con la utilización de inhibidores claves de la vía piroptótica en enterocitos provenientes del modelo murino de enteropatía. **A.** Empleando inhibidor de caspasa-1. **B.** Empleando inhibidor de NLRP3. **C.** Empleando anticuerpo anti-IL1 $\beta$ . En todos los casos flechas ascendentes indican incremento de la expresión, flechas descendentes disminución de la misma y signos = igual expresión con respecto a los ratones control del ensayo. Estos mecanismos demuestran la implicancia de la vía piroptótica en los mecanismos de daño en la mucosa intestinal mediados por p31-43.

Como comentario final, la **Ilustración 20** resume los resultados obtenidos en este capítulo. En ella podemos observar en paralelo los hallazgos tanto en pacientes con enfermedad celiaca como en el modelo murino de enteropatía. En ambos casos, se observó un aumento de la actividad de caspasa-1 por diversas técnicas, acompañados de un incremento de las formas bioactivas de GSDMD e IL-1 $\beta$ , desencadenando piroptosis que contribuiría a un aumento del número de células TUNEL positivas.

El hecho de que una vía de muerte celular proinflamatoria se encuentre claramente involucrada en la progresión del daño en la mucosa intestinal abre las puertas a pensar que otros tipos de muerte celular programada semejantes también podrían estar involucrados. Hipótesis que ampliaremos en el siguiente capítulo.



**Ilustración 20. Resumen de resultados de la vía piroptótica en la EC**

En la ilustración se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos sobre la activación de la vía piroptótica tanto en el modelo de enteropatía como en la patogenia de EC.

## Conclusiones

- Documentamos el incremento de las formas activas de caspasa-1, GSDMD e IL-1 $\beta$ , tanto en pacientes con EC como en nuestro modelo de enteropatía. Esto demuestra la participación de la piroptosis en los mecanismos de daño en la mucosa del intestino delgado proximal.
- Demostramos el rol crucial de caspasa-1 en el proceso proinflamatorio ocasionado por el p31-43 mediante la utilización de un inhibidor específico *in vivo*. Los resultados mostraron una disminución de la activación de moléculas claves de la vía piroptótica y del número de células TUNEL<sup>+</sup> en la *lamina propria*.
- Corroboramos que la inhibición *in vivo* de NLRP3 es capaz de disminuir la activación de caspasa-1 en un modelo murino de enteropatía, estos resultados no se ven reflejados en la activación de GSDMD o IL-1 $\beta$  demostrando que existe contribución de otras vías además de NLRP3.
- Probamos que la inhibición de IL-1 $\beta$  *in vivo* en el modelo murino de enteropatía no es capaz de bloquear la activación del inflammasoma, pero participa activamente en la inducción de apoptosis reflejada con una disminución de la activación de caspasa-3 y del número de células TUNEL<sup>+</sup> en la *lamina propria*.

Nuestros hallazgos revelan una conexión entre la inflamación y otra vías de muerte celular programada, la piroptosis. En este proceso tanto en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca como en nuestro modelo murino de enteropatía, caspasa-1 cumple un rol fundamental y al menos el inflammasoma NLRP3 se encuentra involucrado.

Además de la apoptosis inducida por la administración oral de p31-43 documentada en el capítulo anterior, ahora puede agregarse el p31-43 a la lista de agentes externos capaces de inducir piroptosis *in vivo*.

# Capítulo 3: Necroptosis

## Introducción

### **1. Generalidades de la muerte celular programada por necroptosis**

La necroptosis es un tipo de muerte celular programada, independiente de caspasas, que muestra características morfológicas similares a los que se encuentran en la necrosis, pero que se activa por ligandos diferentes y está regulada por proteínas específicas (Johansson & Hansson, 2016). Anteriormente se pensaba que la necroptosis solo era un proceso alternativo de muerte celular en caso de inhibición de la apoptosis, sin embargo, actualmente se reconoce que la necroptosis desempeña un papel fundamental en la regulación de varios procesos fisiológicos, como durante el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular y la respuesta inmune innata (Y. Liu et al., 2019).

De todas maneras, la necroptosis se considera principalmente una muerte celular proinflamatoria que puede ser desencadenada durante la infección, con el objetivo de asegurar la eliminación de células infectadas por patógenos, promover un estado inflamatorio mediante la liberación de DAMPs e inducir el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de daño (Gong et al., 2020; Negroni et al., 2020).

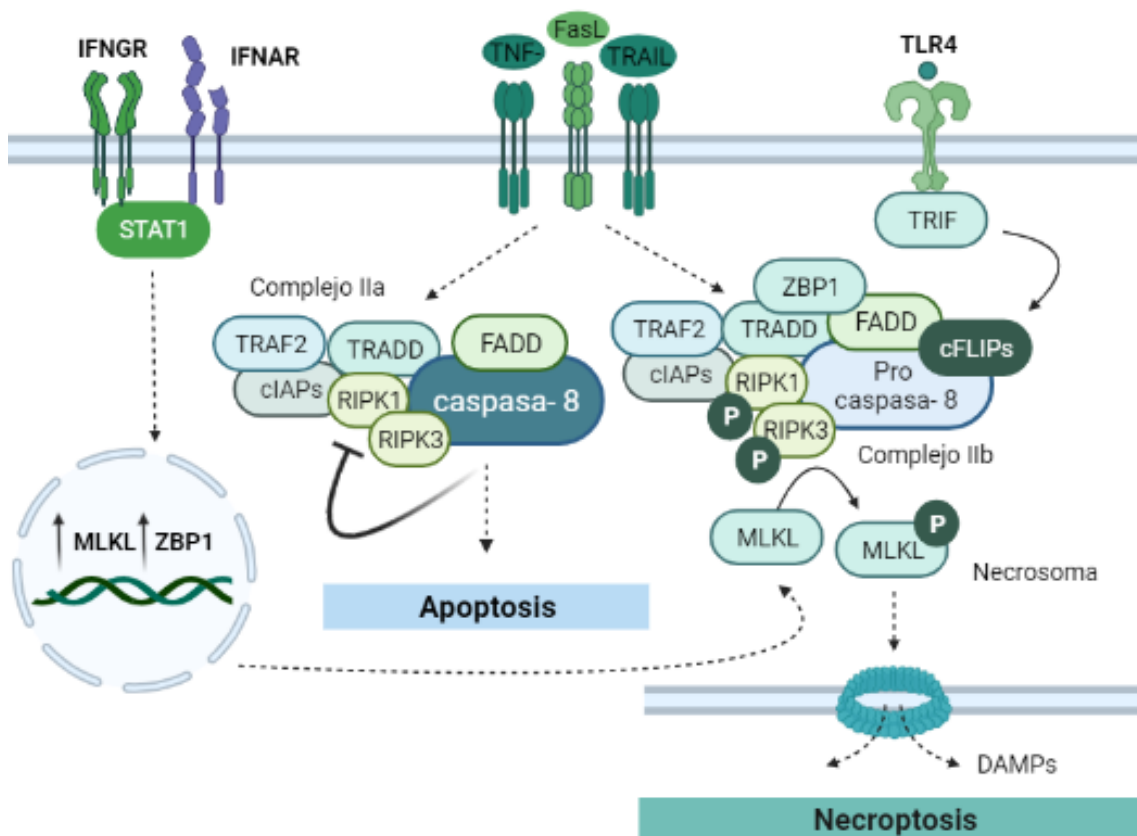
La necroptosis es ejecutada por la activación de los receptores de muerte, incluidos el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1), el receptor Fas (Fas), el ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF-receptor de muerte 1 (TRAILR1), el receptor de interferón (IFNR) y también receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los receptores tipo Toll. Cuando se inactiva caspasa-8, se genera el disparo de necroptosis en lugar de apoptosis, dejando en evidencia que ambas vías de muerte celular pueden ser iniciadas por los mismos estímulos, y que parte de las moléculas mediadoras de ambos procesos son compartidas (Khan et al., 2021; Negroni et al., 2020).

La activación de los receptores mencionados induce la activación de quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina que interactúan con otros receptores. RIPK1 y RIPK3 son moléculas de señalización críticas en la necroptosis y están reguladas por procesos de ubiquitinación. La ubiquitinación de RIPK1 activa NF- $\kappa$ B y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), lo que conduce a la supervivencia celular, mientras que la RIPK1 deubiquitinada induce la vía de apoptosis mediada por caspasa-8. Sin embargo, cuando la apoptosis está bloqueada, es decir cuando caspasa-8 está en presencia de inhibidores, o cuando su activación se impide mediante la inhibición de la proteína adaptadora FADD (Y. Tsuchiya 2015, Imran Khan 2020), la fosfo-RIPK1 se combina con RIPK3 a través del dominio RHIM (motivo de interacción homotípica) de RIP para formar el complejo, denominado necrosoma, que inicia la transducción de señales aguas abajo y desencadena la necroptosis (Ilustración 21).

A continuación, RIPK1 y RIPK3 desempeñan funciones clave en la fosforilación y activación de MLKL (Tang et al., 2019), que conducen al transporte posterior de p-MLKL a la membrana plasmática por vesículas que se unen a la membrana celular interna y forman un poro que permite la salida de moléculas (Samson et al., 2020). Estas iniciarán una respuesta inflamatoria en forma análoga a la función descrita para Gasdermina D en el capítulo anterior. Por esta razón, al igual que la piroptosis, la necroptosis es una muerte celular proinflamatoria, en la que se libera parte del contenido celular al medio (Newton et al., 2019).

RIPK3 es indispensable para la necroptosis, mientras que RIPK1 no está constantemente involucrado en la transducción de señales, de hecho, existe un tipo de necroptosis independiente de RIPK1 (Y. Liu et al., 2019). Esta tiene lugar cuando RIPK3 es activado por la vía TLR3-TRIM mediada por dsRNA viral o por la activación de ZBP1 (Z-DNA Binding Protein 1)(Zhen & Zhang, 2019). La proteína ZBP1, que detecta Z-DNA formado por la rápida replicación de los virus, usualmente se encuentra unida a RIPK1, forma parte de un complejo multimolecular que determinaría la activación de la necroptosis.

La necroptosis está asociada con diversas enfermedades, incluidas el proceso de isquemia/reperfusión, enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, infecciosas, autoinmunes y cáncer, por lo que su inhibición se considera actualmente una estrategia terapéutica prometedora (Negroni et al., 2020).



**Ilustración 21. Vía de muerte celular por necroptosis**

Los estímulos que conducen a la necroptosis dependientes de RIPK1 incluyen TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL e IFN- $\alpha/\beta$ . Después de la unión al receptor, existe un cambio conformacional y se reclutan múltiples proteínas para formar un complejo formado por TRADD, TRAF2, RIPK1, cIAPs, FADD y caspasa-8. Cuando predomina caspasa-8 activa, hay inhibición de RIPK1 y RIPK3 y se forma el complejo Ila. Cuando RIPK1 es desubiquitinado, hay sobre-activación de RIPK3, o predomina c-FLIPs, quien inhibe a caspasa-8, se forma el complejo IIb. Cuando la caspasa-8 es inhibida, RIPK1 y RIPK3 se fosforilan reclutando y fosforilando a MLKL para formar el necrosoma. La oligomerización de MLKL da como resultado la formación de poros en la membrana, con liberación de DAMPs y finalmente la necroptosis. A su vez, los IFNs estimulan la expresión de factores necroptóticos como MLKL y ZBP1. ZBP1 es fundamental para la activación directa de la necroptosis por IFNs cuando se inhibe la caspasa-8, por un mecanismo IFNs/STAT1/ZBP1/RIPK3.

**2. Necroptosis en el intestino delgado**

La necroptosis es un mecanismo de muerte celular relevante en el epitelio intestinal. Los estudios han demostrado que la necroptosis descontrolada de las células epiteliales intestinales puede provocar inflamación intestinal y, en última instancia, producir una fisiopatología similar a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Esto se hizo mediante la creación de ratones knockout condicionales con eliminación de FADD o caspasa-8 en células epiteliales intestinales. Curiosamente, además de la inducción de necroptosis, esta inactivación también resultó en inflamación espontánea y ausencia de células de Paneth, que son excepcionalmente sensibles a la necroptosis probablemente por su alta expresión de RIP3, modulador clave de la necroptosis tanto en humanos como en ratones (Günther et al., 2013; Lueschow & McElroy, 2020; Welz et al., 2011).

Uno de los mediadores proinflamatorios más relevantes en la expresión de proteínas relacionadas con la necroptosis son los IFNs (tipo I, II y III). Estos tres tipos de IFNs pueden regular positivamente la expresión de ZBP1 y MLKL en una variedad de células como fibroblastos, células epiteliales, monocitos, entre otras (Fritsch et al., 2019; Günther et al., 2013; Kuriakose & Kanneganti, 2018).

Los IFNs inducen necroptosis por una vía independiente de RIPK1, a través de la activación de ZBP1 donde intervienen las moléculas JAK / STAT1 (Yang 2019). En este sentido, se ha postulado que los IFNs contribuyen a la inducción de apoptosis y necroptosis en diferentes células del epitelio intestinal de pacientes con Enfermedad de Crohn (Günther et al., 2011, 2019), observación que sugiere que la necroptosis podría contribuir al desarrollo de desórdenes inflamatorios en el intestino.

El mecanismo de necroptosis no se evaluó en la enteropatía presente en pacientes con enfermedad celíaca; sin embargo, muchos de los factores pro-necroptóticos y moduladores positivos de este proceso ya se ha demostrado que están involucrados en esta patología.

En este contexto, en estudios realizados sobre nuestro modelo animal demostramos que la administración intraluminal de p31-43 genera aumento de la expresión de TNF $\alpha$ , IFNs tipo I e IFN $\gamma$  en intestino delgado (Araya et al., 2016) y en conjunto, estos mediadores pueden participar como promotores de la inducción de muerte celular por necroptosis.

La molécula p-MLKL se transporta a la membrana plasmática dentro de las vesículas en forma conjunta con otras proteínas, entre ellas algunas que forman parte de las uniones estrechas. En particular, se observó que ZO-1 inhibe la formación de poros por parte de MLKL (Samson et al., 2020) y debemos destacar que ZO-1 está disminuida en las células epiteliales intestinales de pacientes celíacos, contribuyendo entonces a un aumento de permeabilidad por falta de integridad de las uniones estrechas (Montalto et al., 2002; Pizzuti et al., 2004). Así, la falta del control de la actividad de p-MLKL puede generar una sensibilidad aumentada a la muerte celular por necroptosis.

En resumen, podría existir una corregulación entre proteínas de las uniones estrechas y la señalización necroptótica. Las uniones estrechas, como ya hemos mencionado en la introducción general, son complejos que unen físicamente las membranas plasmáticas de células vecinas, limitan el transporte paracelular y, por tanto, son fundamentales para la función de barrera epitelial (Zihni et al., 2016).

## Justificación

En el capítulo anterior demostramos que además de la apoptosis, la piroptosis juega un papel clave en la progresión del daño a la mucosa intestinal tanto en la patogenia de EC como en el modelo murino de enteropatía. Teniendo en cuenta que dentro de las vías de muerte celular programada proinflamatorias tanto la piroptosis como la necroptosis comparten características morfológicas, incluida la formación de poros en la membrana plasmática y la ruptura de la misma, desencadenando en ambos casos, una respuesta inflamatoria con la liberación de una serie de patrones moleculares asociados al daño (DAMP), estudiar la posibilidad de que la necroptosis también tome un papel fundamental en el proceso se vuelve cada vez más interesante.

Nuestras observaciones en el duodeno humano y el modelo animal sugieren que los mediadores presentes en condiciones inflamatorias pueden promover la inducción de muerte celular por necroptosis. En este capítulo nos centraremos en el estudio de la implicancia de la necroptosis como muerte celular programada proinflamatoria contribuyente al daño a la mucosa duodenal.

## Objetivos específicos

- Determinar la implicancia de la necroptosis en la progresión y desarrollo del daño a la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca, haciendo hincapié en mediadores claves de la vía de muerte celular como lo son ZBP1, RIPK3, MLKL.
- Evaluar si la necroptosis se encuentra activa en el modelo murino de enteropatía por administración de p31-43.
- Realizar una evaluación conjunta de las vías de muerte celular en la mucosa intestinal, la posible corregulación entre apoptosis, piroptosis y necroptosis y sus papeles en el desarrollo y progresión de la patología.



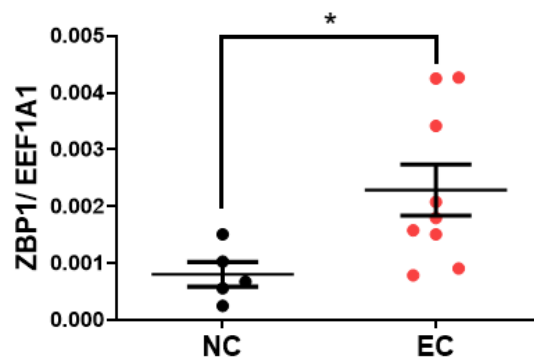
## Resultados

### 1. Evaluación de muerte celular por necroptosis

#### 1.1 Análisis de la expresión de componentes claves de la necroptosis en la mucosa duodenal de pacientes celíacos

Aunque en la patogenia de EC existen varios mediadores directamente relacionados con la inducción de necroptosis (TNF- $\alpha$ , IFNs tipo I e IFN $\gamma$ ), esta vía de muerte celular ha sido poco estudiada en el intestino delgado en condiciones no infecciosas y en especial, en pacientes celíacos.

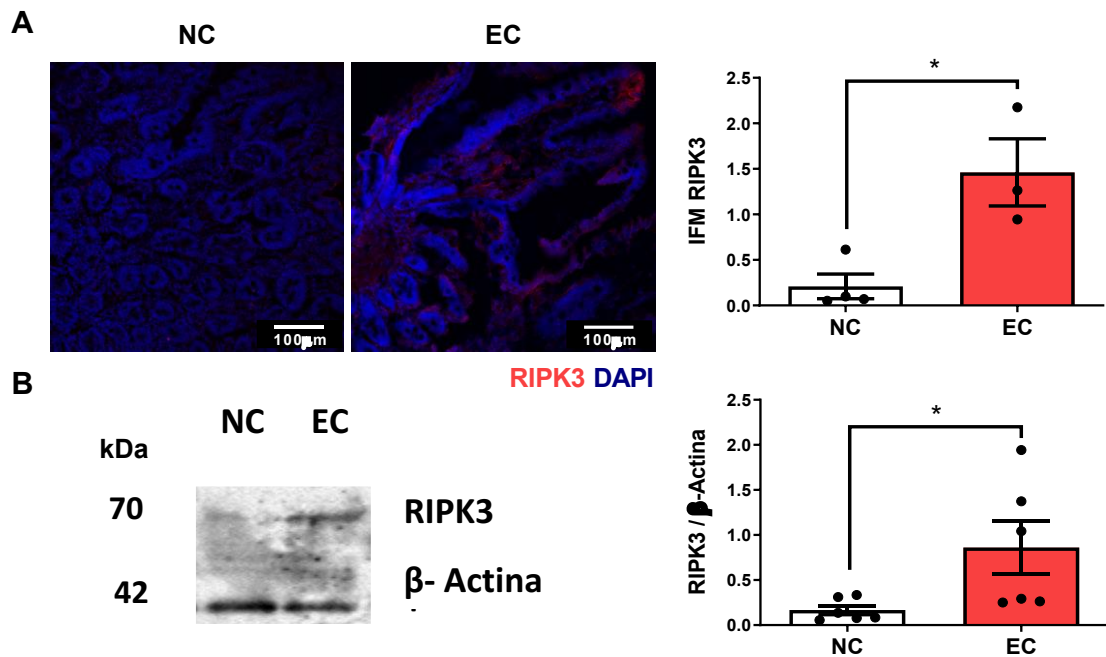
Con el interés de evidenciar si la necroptosis se encuentra activa en la mucosa duodenal de pacientes celíacos, en primer lugar, evaluamos la expresión de ZBP1, mediador que actualmente es señalado como elemento relevante en el control de la vía. En la **Figura 33**, se observa que la expresión a nivel de ARNm de ZBP1 se encuentra aumentada significativamente en la mucosa duodenal de pacientes celíacos respecto a muestras de la población control.



#### **Figura 33. Mayor expresión de ZBP1 en mucosa duodenal de pacientes celíacos**

Resultados de qPCR para el gen ZBP1 referidos a EEF1A1 como gen de referencia (NC = 9, EC = 5). \* $p < 0,05$ ; Prueba *t*-Student para datos no pareados.

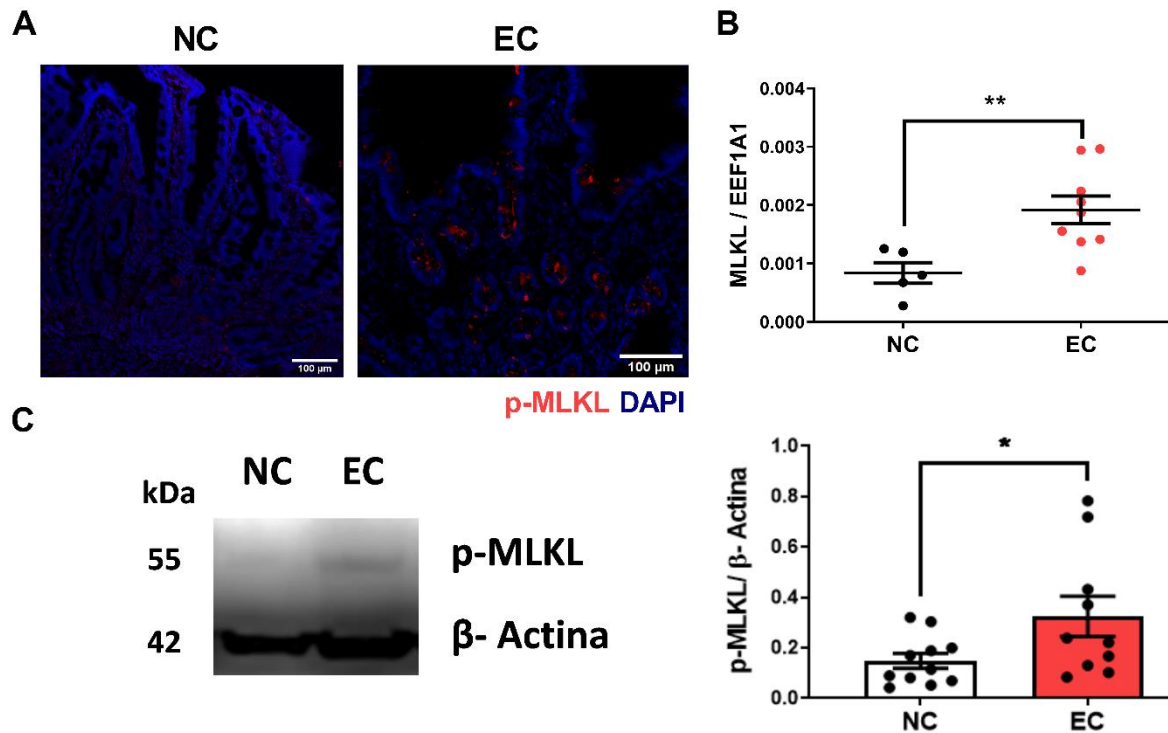
Luego, estudiamos por inmunofluorescencia indirecta la expresión de RIPK3 en secciones de duodeno. Se observó un incremento significativo en la expresión de RIPK3 en la mucosa duodenal de pacientes celíacos en comparación con las muestras provenientes de individuos de la población control (**Figura 34.A**). Este aumento correlacionó con el incremento de la expresión de RIPK3 observado mediante la técnica de western blot en extractos de proteínas de piezas de biopsias duodenales (**Figura 34.B**).



**Figura 34. Mayor expresión de RIPK3 en el intestino delgado de pacientes celíacos**

**A. Izquierda:** Imágenes representativas de marcación con RIPK3 en el intestino delgado de pacientes con enfermedad celíaca y controles. Tinción DAPI para núcleos (azul), RIPK3 en rojo. **Derecha:** Intensidad de fluorescencia media de la marcación de RIPK3 en secciones de mucosa duodenal de EC ( $n = 4$ ) y NC ( $n = 4$ ). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **B.** Imágenes representativas por western blot de RIPK3 en pacientes celíacos (EC) y no celíacos (NC) y cuantificación de la activación de RIPK3 expresada como la relación de RIPK3:  $\beta$ - actina en EC ( $n = 6$ ) y NC ( $n = 6$ ). Se utilizó beta actina como proteína de control de carga. \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student para datos no apareados.

Como indicador final de la activación de la vía de necroptosis, estudiamos la versión de MLKL fosforilada que corresponde a su forma biológicamente activa. En primer lugar, se realizaron imágenes mediante inmunofluorescencia indirecta, en cortes de biopsias duodenales, que sugirieron un incremento de p-MLKL en los pacientes con enfermedad celíaca respecto de los pacientes control. Se pudo observar una distribución particular de la marca a nivel de las criptas (**Figura 35.A**). Al evaluar por qPCR el nivel de transcripto, se observó que los niveles de ARNm de MLKL se encontraban significativamente elevados en la mucosa duodenal de pacientes celíacos comparados con los pertenecientes a la población control (**Figura 35.B**). De manera relevante, el análisis por western blot de proteínas totales extraídas de biopsias duodenales, mostró que la forma biológicamente activa y formadora de poros en la membrana celular, se encuentra significativamente aumentada en muestras de biopsias duodenales de pacientes celíacos comparados con los controles sanos (**Figura 35.C**).



**Figura 35. Mayor expresión de p-MLKL en el intestino delgado de pacientes celíacos**

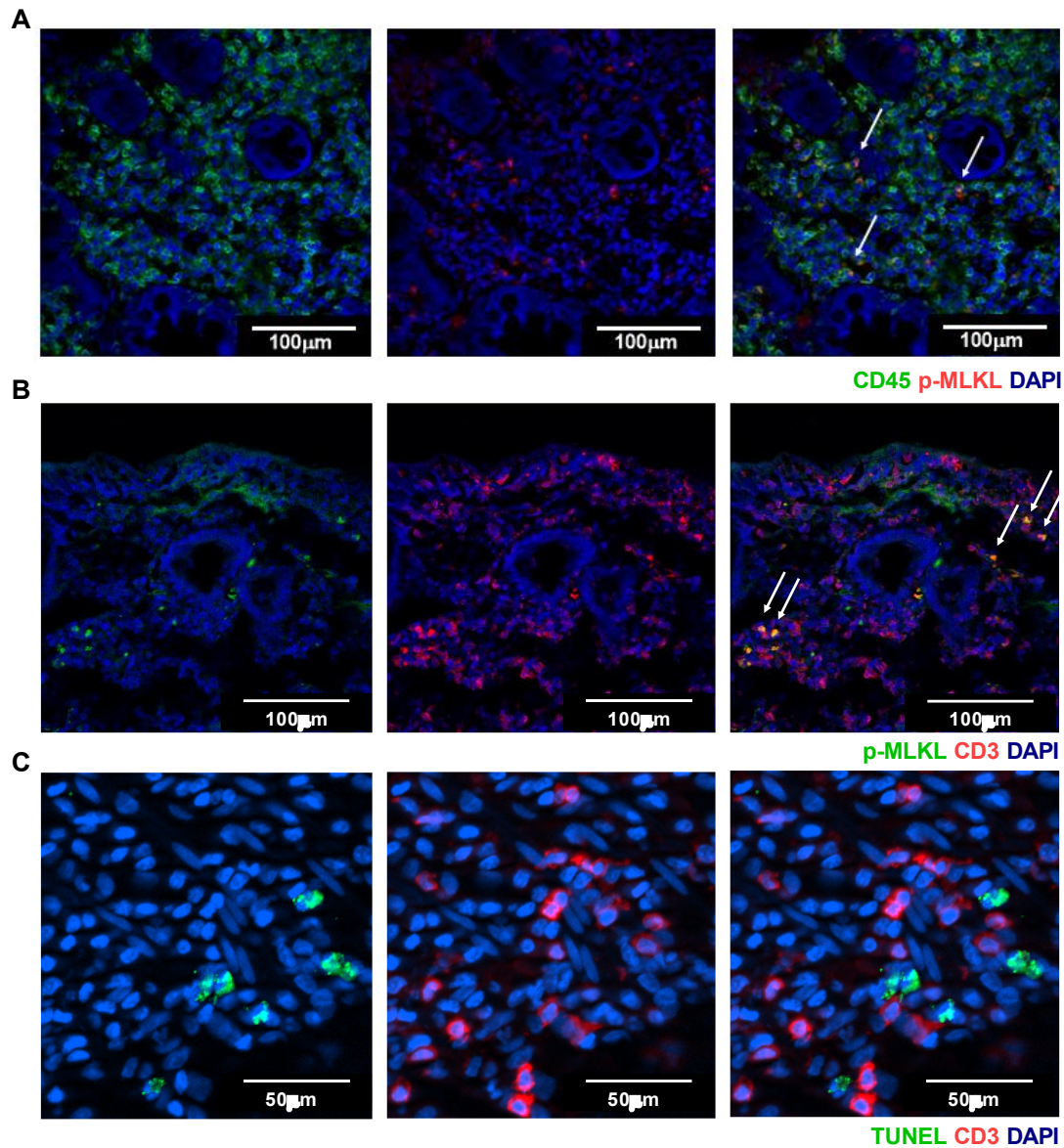
**A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta para p-MLKL en la mucosa duodenal de pacientes con EC y NC. p-MLKL (rojo), Núcleos (azul). **B.** Resultados de qPCR para el gen p-MLKL referidos a EEF1A1 como gen de referencia (NC = 5, EC = 9). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados **C. Izquierda:** Imágenes representativas por western blot de fragmentos de p-MLKL en pacientes con EC y NC. Se utilizó beta actina como proteína de control de carga. **Derecha:** Análisis cuantitativo de las bandas expresadas como la proporción de p-MLKL:  $\beta$ -actina en pacientes con EC (n=10) y NC (n=11). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados.

## 1.2 Caracterización de las poblaciones de células p-MLKL<sup>+</sup> en lamina propia y fondo de criptas de pacientes celíacos

Dado el patrón de marca para p-MLKL observado en el análisis por microscopía de fluorescencia indirecta, decidimos caracterizar qué células de la lamina propia expresaban en mayor proporción p-MLKL. Para ello se realizaron ensayos de marca combinada con CD45, para evidenciar células de origen hematopoyético (Figura 36.A).

Con las imágenes obtenidas se pudo concluir que la mayoría de las células p-MLKL<sup>+</sup> encontradas en la lamina propia eran CD45<sup>+</sup>. Con esos hallazgos decidimos caracterizar el linaje de dichas células doble positivas, debido a que se ha documentado que ciertos linfocitos T al activarse su TCR expresan p-MLKL (Ch'en et al., 2011) realizamos una marcación combinada de p-MLKL y CD3.

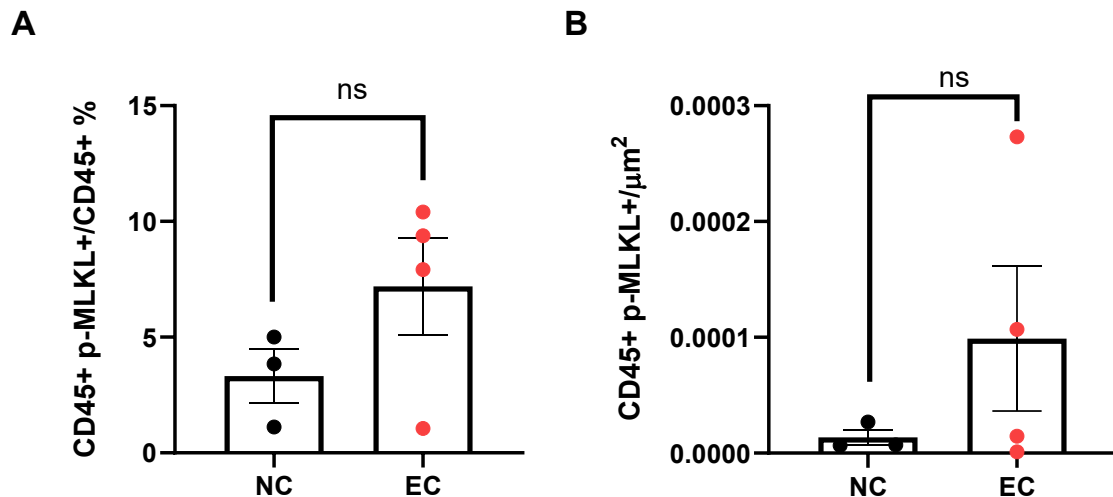
Esta inmunofluorescencia indirecta demostró que la mayoría de las células p-MLKL<sup>+</sup> en la lamina propia duodenal de los pacientes con enfermedad celíaca activa, resultaron ser a su vez CD3<sup>+</sup> (Figura 36.B). No debe pasarse por alto que, previamente mediante la técnica de TUNEL demostramos que muy pocas células CD3<sup>+</sup> se encuentran en eventos avanzados de muerte celular, reflejados por una reacción de TUNEL positiva (Figura 36.C).



**Figura 36. Caracterización de células p-MLKL<sup>+</sup> en la lamina propia del intestino delgado de pacientes celíacos**

Imágenes representativas de inmunofluorescencia en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos. **A.** DAPI marca los núcleos en azul, las células p-MLKL<sup>+</sup> se observan en rojo y el marcador de linaje: CD45 se observan en verde. **B.** DAPI (marca los núcleos en azul, las células p-MLKL<sup>+</sup> se observan en verde y el marcador de linaje: CD3 se observa en rojo. **C.** DAPI marca los núcleos en azul, las células TUNEL<sup>+</sup> se observan en verde y CD3<sup>+</sup> se observan en rojo. En todos los casos las flechas blancas indican células doble positivas.

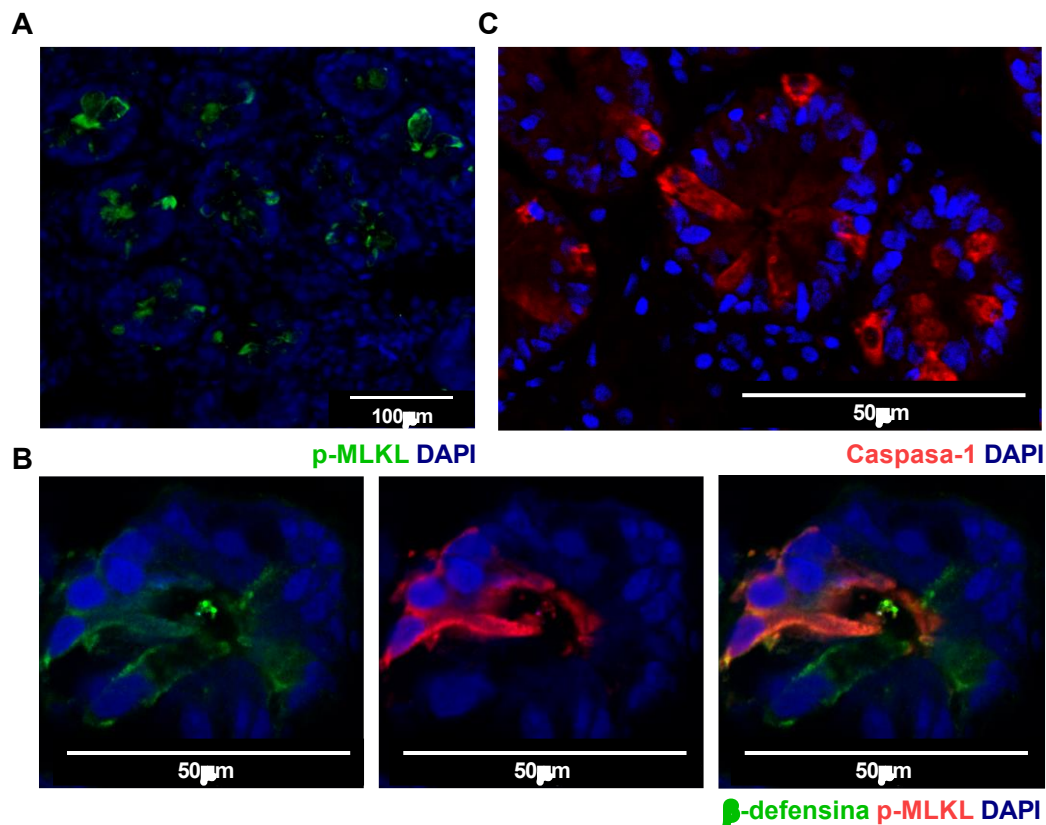
La proporción de células doble positivas para p-MLKL y CD45 respecto del total de células CD45<sup>+</sup> en la *lamina propria* de pacientes celíacos no demostró una diferencia significativa respecto de los pertenecientes a la población control (Figura 37.A), sin embargo, si presentó una tendencia al aumento que fue de la mano con la densidad de células doble positivas en el área total de la biopsia estudiada (Figura 37.B).



**Figura 37. Recuento de células CD45<sup>+</sup> que expresan p-MLKL en lamina propia de pacientes celíacos**

Recuentos de células doble positivas (CD45<sup>+</sup>, p-MLKL) en cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos (n=4) y población control (n=3) expresados como: **A.** porcentaje de células CD45<sup>+</sup> p-MLKL<sup>+</sup> respecto al número total de células CD45<sup>+</sup>. **B.** Densidad de células CD45<sup>+</sup> p-MLKL<sup>+</sup> por área ( $\mu\text{m}^2$ ). ns; Prueba t-Student para datos no pareados.

La observación del patrón de marca de p-MLKL a nivel epitelial, también fue llamativa, en especial en las células del fondo de la cripta (Figura 38.A). La expresión en esta región de la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad celíaca activa nos recordó un patrón similar observado en las inmunofluorescencias indirectas para caspasa-1, como se muestra en la Figura 38.B. Esa observación no pudo evaluarse en el Capítulo 2 Sección 1.2 debido a una incompatibilidad para realizar la técnica de los anticuerpos que disponíamos. En el caso de p-MLKL pudimos realizar una marca combinada con  $\beta$ -defensina, que identifica células de Paneth, para caracterizar las células positivas observadas en el fondo de las criptas, y confirmamos que en las células de Paneth, los procesos de muerte celular proinflamatoria, como necroptosis o piroptosis, están activos (Figura 38. C).



**Figura 38. Caracterización de poblaciones de células  $p\text{-MLKL}^+$  en las criptas del intestino delgado de pacientes celíacos**

Imágenes representativas de la marcación de  $p\text{-MLKL}$  en criptas duodenales de pacientes celíacos. En todas ellas se observan los núcleos en azul. **A.** Inmunofluorescencia indirecta para  $p\text{-MLKL}$  (verde). **B.** Inmunofluorescencia indirecta para la marca combinada de  $p\text{-MLKL}$  (rojo) y células  $\beta\text{-defensina}$  (verde). **C.** Inmunofluorescencia indirecta para caspasa-1 (rojo).

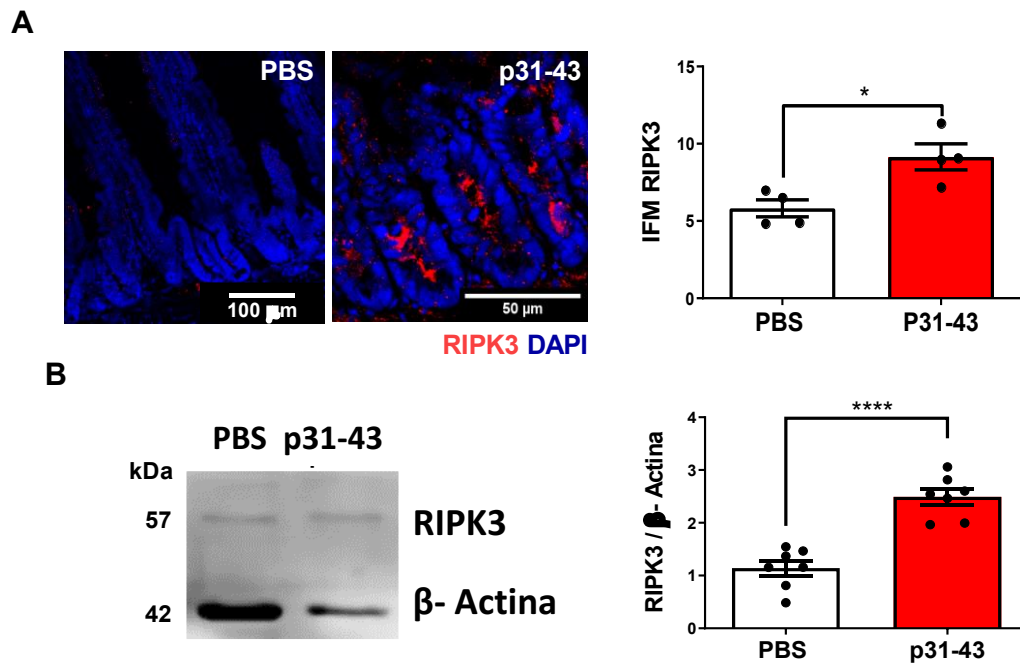
## **2. Evaluación de muerte celular por necroptosis en un modelo murino de enteropatía**

Como mencionamos, nuestro modelo experimental de enteropatía mostró que p31-43 genera aumento de la expresión de  $\text{TNF-}\alpha$ , IFNs tipo I e  $\text{IFN}\gamma$  en el intestino delgado (Araya 2016). En conjunto, estos mediadores sugieren que, al menos en parte, la muerte celular observada podría vincularse a la necroptosis. Por esta razón, estudiamos la expresión de RIPK3, como elemento crítico en el punto de decisión de las vías de apoptosis y necroptosis.

El análisis por inmunofluorescencia en cortes histológicos de segmentos de intestino delgado mostró un aumento de la expresión de RIPK3, 16hs después de la administración intragástrica de p31-43, particularmente en células epiteliales de las criptas. La expresión de RIPK3 fue claramente citoplasmática (**Figura 39.A**). El análisis de densidad de fluorescencia media mostró en forma semicuantitativa, un aumento significativo en intestino delgado proximal de animales tratados con p31-43 comparados con los controles.

El incremento de la expresión de RIPK3 fue confirmado por western blot donde analizamos la fracción de proteínas totales de segmentos de intestino delgado proximal (Figura 39.B).

Encontramos que el tratamiento con p31-43 fue capaz de inducir un aumento significativo de RIPK3, sugiriendo que la necroptosis podría ser inducida en estas condiciones.



**Figura 39. Mayor expresión de RIPK3 en el intestino delgado de ratones tratados con p31-43**

**A.** *Izquierda:* Imágenes representativas de la marcación de RIPK3 en el intestino delgado de ratones C57BL/6 16 h después de la administración intragástrica de PBS o 20 μg de gliadina p31-43. Tinción DAPI para núcleos (azul), RIPK3 (rojo). *Derecha:* Intensidad de fluorescencia media de la marcación de RIPK3 en secciones de mucosa de intestino delgado proximal (PBS = 4, p31-43 = 4). \*  $p < 0,05$ ; Prueba t-Student para datos no pareados. **B.** Análisis de western blot representativo y análisis cuantificación de la activación de RIPK3 expresada como la relación de RIPK3: β-actina 16 hs después de la administración de p31-43 (n = 7) o PBS (n = 7). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; Prueba t de Student para datos no apareados.

## Discusión

Como queda en evidencia en los capítulos anteriores, la muerte celular programada ha sido un área de importante interés y en constante crecimiento durante las últimas décadas. Junto a la apoptosis y la piroptosis se encuentran otras vías de muerte celular programada y entre ellas, podemos destacar a la necroptosis dado que ha sido estudiada en el contexto de la mucosa del intestino delgado en situaciones no infecciosas (Günther et al., 2011; S. H. Lee et al., 2020; Negroni et al., 2015, 2020; Welz et al., 2011). A su vez, esta vía es inducida por los mismos ligandos de receptores de muerte que desencadenan la apoptosis extrínseca (TNF- $\alpha$ , CD95L, TRAIL) que ya hemos demostrado se encuentran sobre-activados en la patogenia de EC (Khan et al., 2021; Tsuchiya et al., 2015).

En este capítulo, hemos evidenciado un incremento de RIPK3 en la mucosa duodenal de los pacientes con EC y en intestino delgado proximal de ratones con nuestro modelo de enteropatía. Es importante recalcar que con la metodología que contamos para el desarrollo de nuestros experimentos no tuvimos la posibilidad de determinar p-RIPK3, forma activa de la proteína. En la bibliografía se describe que los niveles de la forma biológicamente activa suelen ser muy bajos (Xie et al., 2020), y que posiblemente se requiera de condiciones más severas de inducción de necroptosis para ponerlo en evidencia, como por ejemplo modelos de infección. Debe tenerse en cuenta que no estamos utilizando ningún activador de la vía y el solo hecho de documentar un incremento de la versión precursora, simplemente con la utilización del péptido p31-43 para inducir una enteropatía estéril, es de suma relevancia.

La posibilidad de que se produzca necroptosis en el intestino está respaldada por el hecho de que la inhibición o la delección genética de la caspasa-8 puede provocar la activación tanto de RIPK3 como de MLKL y desencadenar disfunción de la barrera e inflamación en el intestino delgado (Newton et al., 2019; Schwarzer et al., 2020). En el *Capítulo 1 Sección 3.2* del presente trabajo encontramos que caspasa-8 activa es significativamente más elevada en células epiteliales de ratones tratados con p31-43, pero no en la *lamina propria*, donde los resultados provenientes del western blot fueron no significativos, sugiriendo que los niveles más bajos de caspasa-8 pueden conducir a la aparición de células necroptóticas en la *lamina propria* y la región de las criptas, tal como lo hemos observado en el patrón de marcación para RIPK3 y p-MLKL.

Los complejos de señalización RIP1/RIP3 o RIP3/TRIF reclutan y fosforilan aguas abajo MLKL, provocando la ruptura de la membrana plasmática, y la liberación de DAMPs que amplifican la respuesta inflamatoria (Tang et al., 2019). Siguiendo esta línea hemos demostrado un incremento de la expresión de p-MLKL en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celiaca. Como hemos mencionado, esta marca en particular presentó un patrón de expresión llamativo tanto a nivel de la *lamina propria* como en el fondo de las criptas, expresión que nos recordó un patrón similar de marca que ya habíamos observado en las inmunofluorescencias indirectas para caspasa-1 (*Capítulo 2 Sección 1.2*).



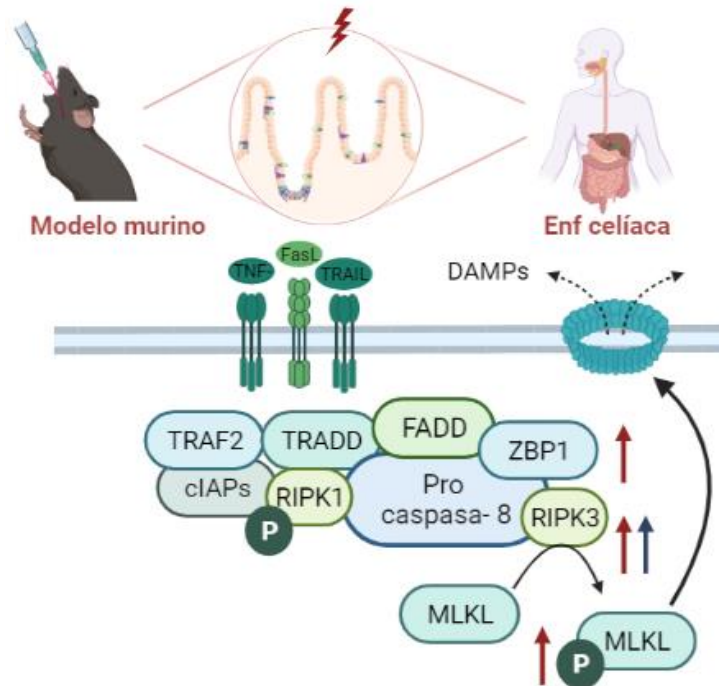
Las células del fondo de la cripta positivas para p-MLKL resultaron ser células de Paneth, confirmando que, en estas células, los procesos de muerte celular proinflamatoria, como necroptosis o piroptosis, están activos. Este hallazgo va de la mano con el hecho de que en la patogenia de EC se demostró que estas células están sujetas a estrés, por lo que su fisiología puede verse alteradas por este tipo de procesos (Di Sabatino et al., 2008). Un hecho similar fue reportado en otra patología intestinal, la Enfermedad de Crohn, donde se ha demostrado el incremento de la expresión de RIPK3 en estas células, sugiriendo un papel potencial de la necroptosis en su patogenia. Se considera que la liberación crónica de IFN tipo III induciría necroptosis en células de Paneth mientras que los enterocitos morirían principalmente por apoptosis, mostrando una coexistencia entre el proceso de apoptosis y necroptosis en el intestino (Günther et al., 2019).

La caracterización de células p-MLKL<sup>+</sup> en la *lamina propria* de pacientes con enfermedad celíaca determinó que principalmente representaban a células CD3<sup>+</sup>. En este sentido se ha documentado que la necroptosis está implicada en la regulación de la proliferación y supervivencia de células T activadas por antígeno (Negróni et al., 2020). Debemos tener presente que el análisis por la técnica de TUNEL mostró que solo el 5% de las células TUNEL<sup>+</sup> fueron también positivas para CD3. Estos hallazgos sugieren que las células CD3<sup>+</sup> en *lamina propria* pueden sufrir la inducción de procesos de muerte por necroptosis, demostrados por el incremento de la expresión de p-MLKL, sin llegar a superar el umbral de formación de poros en la membrana plasmática necesario para alcanzar eventos avanzados de muerte celular con fragmentación del ADN, lo que se refleja en una reacción de TUNEL negativa (Ch'en et al., 2008).

Es interesante considerar que los linfocitos T activados deben sufrir una fase de contracción que limita la expansión descontrolada de linfocitos por activación específica. Aunque el mecanismo de muerte es apoptosis, se observó que la necroptosis podía explicar parte de la muerte de linfocitos T activados (Ch'en et al., 2008, 2011). Este es un aspecto sumamente interesante para analizar, especialmente en un tejido como el intestino delgado en EC que se encuentra continuamente sometido a activación T específica por los péptidos de gluten. Y a su vez, donde la señal local derivada de IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  puede promover muerte celular.

Recientemente, se observó que la señalización conjunta IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  puede inducir muerte en células epiteliales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, independientemente de las vías canónicas (Woznicki et al., 2021). De esta manera los circuitos de control de muerte pueden ser aún más complejos en los tejidos con inflamación crónica. De forma similar, el análisis de muestras de colon de pacientes con colitis ulcerosa, o en muestras de colon de ratones de un modelo de DSS, también mostraron la presencia de linfocitos T que expresaban MLKL (S. H. Lee et al., 2020).

Los resultados de este capítulo, que se encuentran resumidos en la **Ilustración 22**, sugieren que la necroptosis puede desempeñar un papel importante en la patogenia de la enfermedad celíaca. Así como también puede participar en la activación simultánea de otras vías de muerte celular programada.



**Ilustración 22. Resumen de resultados de la vía necroptótica en la enfermedad celíaca**

En la ilustración se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos sobre la activación de la vía necroptótica tanto en el modelo de enteropatía (flecha azul) como en la patogenia de EC (flechas rojas). En ambos casos, se observó un aumento en la expresión de RIPK3 por diversas técnicas, acompañado en el caso de los pacientes celíacos con un incremento de la señalización a través de ZBP1 y un aumento de la activación del componente clave de la vía p-MLKL. Estos mecanismos demuestran la implicancia de la vía en la progresión del daño a la mucosa.

Además de su estrecha relación con la apoptosis, la activación de MLKL durante la necroptosis demostrada en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca, podría ser suficiente para inducir el procesamiento y la liberación de IL-1 $\beta$  activa independiente de GSDMD, además de desencadenar la salida de potasio y el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 (Gutierrez et al., 2018), mostrando un claro ejemplo de la conexión entre ambas vías. La necroptosis conduce a la liberación de moléculas endógenas que amplifican la respuesta inflamatoria (Kearney & Martin, 2017). En forma similar a la piroptosis, la liberación de DAMPs puede activar los inflammasomas, facilitar el reclutamiento de células inflamatorias y promover respuestas posteriores que conducen a la activación de la piroptosis, demostrando así la estrecha conexión de estas vías de muerte celular programada (Christgen et al., 2020; Kesavardhana et al., 2020; Tang et al., 2019).

Finalmente, el hecho de que tanto necroptosis como apoptosis y piroptosis pueden ser iniciados por los mismos estímulos, y que parte de las moléculas mediadoras de estos procesos se ven solapadas, hace muy difícil el estudio de cada vía en particular y más aún en los distintos modelos experimentales que manejamos, donde trabajamos con un tejido complejo como lo es la mucosa intestinal de pacientes celíacos o la proveniente de nuestro modelo murino.

El mayor interrogante ahora es comprender si estas vías se gatillan en simultáneo en una misma célula y existe un control propio que determina la vía seguida, o si el fenómeno observado es debido a la activación de una vía particular en una determinada célula que se desdibuja al estudiar el tejido como un todo.

Intentando arrojar luz a este interrogante, como hemos mencionado en la introducción general, recientemente se ha planteado la existencia de un fenómeno denominado PANoptosis que se define como el resultado de vías de muerte celular interrelacionadas y conservadas evolutivamente, que conducen a diferentes resultados (apoptosis, necroptosis y piroptosis) (Samir et al., 2020). Además, se sugiere que este proceso involucra una vía única controlada por un complejo multiproteico llamado "PANoptosoma" basado en ZBP1, y particularmente aquí hemos demostrado que ZBP1 se encuentra sobre-expresado en pacientes con enfermedad celíaca. Las respuestas inflamatorias impulsadas por la activación del PANoptosoma se han postulado en variadas enfermedades entre las que, basados en nuestras observaciones, podríamos agregar a la enfermedad celíaca.

Ya que la coexistencia de múltiples vías de muerte celular se ha encontrado en otras afecciones inflamatorias como la enfermedad de Crohn (Günther et al., 2019). Es importante plantearnos la posibilidad de que muchas de las vías de muerte celular descritas en la actualidad pueden también estar involucradas de alguna u otra manera. Sin ir más lejos la autofagia se ha asociado a la enfermedad celíaca (Comincini et al., 2017) y existen otros fenómenos como la ferroptosis que no han sido abordados aún, pero que también podrían participar en la patogenia, ya que cambios en la peroxidación lipídica asociados con la ferroptosis pueden ocurrir en enfermedad celíaca y se ha demostrado que estos mediadores pueden inducir la apoptosis en presencia de un sistema antioxidante competente (Glutatión y sistemas de tiorredoxina) o en situaciones de deficiencia donde las condiciones oxidativas activan factores como MLKL, RIPK1/3, NLRP3, caspasa-1 y GSDMD dando lugar a la progresión de vías proinflamatorias (Perez et al., 2021).

Los hallazgos mostrados en este capítulo indican que la necroptosis se encuentra activa en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca, y también presentan elementos que sugieren que es posible evidenciarla en el intestino delgado proximal de ratones en nuestro modelo de enteropatía. En este último aspecto tenemos la ventaja de profundizar los estudios sobre esta vía empleando bloqueos funcionales para determinar el rol de la necroptosis en el daño a la mucosa intestinal. Esto es de especial interés ya que no se han realizado estudios en un modelo de inflamación estéril hasta el presente.

## Conclusiones

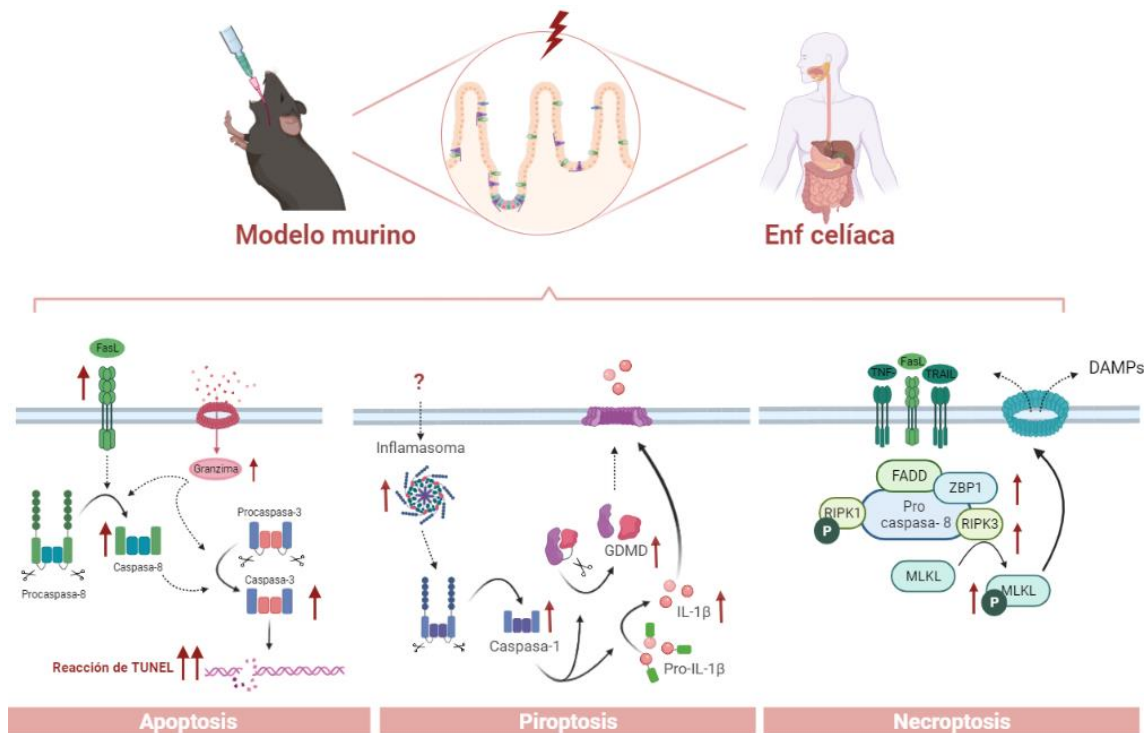
- Determinamos que mediadores claves de la vía de la necroptosis están activos en enfermedad celíaca, evidenciado por un incremento en la expresión y activación de ZBP1, RIPK3 y p-MLKL.
- El análisis de expresión de p-MLKL indicó que las células CD3<sup>+</sup> explicaron la mayoría de las células p-MLKL<sup>+</sup> en la *lamina propria*, mientras que las células  $\beta$ -defensina<sup>+</sup> (células de Paneth) explicaron las p-MLKL<sup>+</sup> en el fondo de las criptas de la mucosa duodenal de los pacientes celíacos.
- La evaluación en el modelo murino de enteropatía mostró un incremento de la expresión de RIPK3, indicando que la vía de la necroptosis también puede ser inducida en este modelo. Esto permitirá el avance en la caracterización de la necroptosis realizando estudios funcionales con bloqueos *in vivo* de elementos críticos de la vía.
- Los pacientes con enfermedad celíaca no tratados tienen un mayor número de células que mueren por apoptosis y por otras vías de muerte celular programada proinflamatorias, como piroptosis y necroptosis. Estas vías de muerte celular podrían estar interconectadas y modularse entre sí.

En base a los puntos detallados concluimos que se ha logrado confirmar que la vía de la necroptosis se encuentra activa en la mucosa duodenal de pacientes con EC. En el caso de nuestro modelo murino de enteropatía se requiere extender los estudios mediante el empleo de inhibidores de la vía con el fin de esclarecer su participación. Sin embargo, es destacable el incremento de la versión precursora de RIPK3 documentado, como un marcador de activación de la vía, simplemente por administración del péptido p31-43. Finalmente, el empleo de este modelo de inflamación estéril permitirá el desarrollo de una estrategia novedosa para avanzar en el conocimiento del rol de la necroptosis en el intestino delgado.

## Conclusión General

En este trabajo, hemos demostrado la implicancia en la progresión del daño a la mucosa del intestino delgado de múltiples vías de muerte celular programada en condiciones inflamatorias que coexisten en un mismo tejido, evaluadas tanto en muestras humanas como en un modelo experimental en ratón (**Ilustración 23**).

Confirmamos que la vía de la apoptosis, descrita como la vía fundamental de eliminación masiva de células en el epitelio, se encuentra activa. De manera llamativa, observamos que existe un alto número de células muertas en la *lamina propria*, hallazgo que nos impulsó a estudiar otras posibles vías de muerte celular proinflamatoria. De esta forma, demostramos el rol de la piroptosis en la mucosa del intestino delgado tanto en una situación inflamatoria crónica (duodeno de pacientes celíacos) como en el modelo de enteropatía, al probar que las formas activas de moléculas centrales en esta vía (caspasa-1, IL-1 $\beta$  y GSDMD) se encuentran activadas. Empleando el modelo experimental, evidenciamos que el bloqueo *in vivo* de la vía de la piroptosis, mediante inhibición farmacológica o inmunológica (inhibidores de NLRP3, caspasa-1 o anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ , respectivamente) impide la inducción de daño mediante el estímulo inflamatorio. Además, la observación de la expresión de RIPK3 y p-MLKL permitió demostrar la actividad de la vía de la necroptosis en intestino delgado de ratón.



**Ilustración 23. Resumen integral de las vías de muerte celular programada involucradas en la patogenia de EC**

*En la ilustración se resumen de manera esquemática los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral. Demostramos el papel de la apoptosis en la progresión del daño a la mucosa intestinal en la enfermedad celiaca, además de la implicancia de vías de muerte celular proinflamatorias como la piroptosis y la necroptosis, mecanismos que no habían sido estudiados en condiciones no infecciosas.*

En el desarrollo de la tesis doctoral se han estudiado, por primera vez, las vías de muerte proinflamatorias en intestino delgado en condiciones no infecciosas, y en el contexto de la enfermedad celíaca. La amplificación de los mecanismos inflamatorios y de daño tisular por liberación de DAMPS, como consecuencia de la piroptosis y necroptosis, constituyen mecanismos no descritos en la enteropatía del intestino delgado. A su vez, la liberación de alarminas no solo amplificaría la inflamación local si no que podría potenciar el desarrollo de mecanismos de daño en tejidos distantes.

La relevancia de estos resultados yace en la descripción por primera vez del rol de ejes proinflamatorios en la mucosa del intestino delgado, permitiendo profundizar el conocimiento de la biología de la mucosa intestinal, pudiendo ser utilizados en la prevención de la EC o bien en la implementación de estrategias terapéuticas que reduzcan la progresión o severidad de las complicaciones a largo plazo y el desencadenamiento de las enfermedades asociadas.

## Referencias bibliográficas

- Abadie, V., Kim, S. M., Lejeune, T., Palanski, B. A., Ernest, J. D., Tastet, O., Voisine, J., Discepolo, V., Marietta, E. v., Hawash, M. B. F., Ciszewski, C., Bouziat, R., Panigrahi, K., Horwath, I., Zurenski, M. A., Lawrence, I., Dumaine, A., Yotova, V., Grenier, J. C., ... Jabri, B. (2020). IL-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease. *Nature*, *578*(7796), 600–604. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2003-8>
- Abadie, V., Sollid, L. M., Barreiro, L. B., & Jabri, B. (2011). Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annual Review of Immunology*, *29*, 493–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-040210-092915>
- Ahluwalia, S. C., Damberg, C. L., Silverman, M., Motala, A., & Shekelle, P. G. (2017). What Defines a High-Performing Health Care Delivery System: A Systematic Review. In *Joint Commission Journal on Quality and Patient Safety* (Vol. 43, Issue 9, pp. 450–459). Joint Commission Resources, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcjq.2017.03.010>
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, *113*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Akira Nagafuchi. (2001). *Molecular architecture of adherens junctions*.
- Alizadeh, A., Akbari, P., Garssen, J., Fink-Gremmels, J., & Braber, S. (2021). Epithelial integrity, junctional complexes, and biomarkers associated with intestinal functions. In *Tissue Barriers*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1996830>
- Allegretti, Y. L., Bondar, C., Guzman, L., Cueto Rua, E., Chopita, N., Fuertes, M., Zwirner, N. W., & Chirido, F. G. (2013). Broad MICA/B Expression in the Small Bowel Mucosa: A Link between Cellular Stress and Celiac Disease. *PLoS ONE*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073658>
- Amarante-Mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R., & Bortoluci, K. R. (2018). Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Frontiers in Immunology*, *9*(OCT), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>
- Araya, R. E., Castro, M. F. G., Carasi, P., McCarville, J. L., Jury, J., Mowat, A. M., Verdu, E. F., & Chirido, F. G. (2016). Mechanisms of innate immune activation by gluten peptide p31-43 in mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *311*(1), G40–G49. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00435.2015>
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 411–420). <https://doi.org/10.1038/nri2316>
- Augustin, M. T., Kokkonen, J., & Karttunen, T. J. (2005). Evidence for increased apoptosis of duodenal intraepithelial lymphocytes in cow's milk sensitive enteropathy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *40*(3), 352–358. <https://doi.org/10.1097/01.MPG.0000151748.07469.BF>
- Barone, M. V., Troncone, R., & Auricchio, S. (2014). Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa.

- International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20518–20537. <https://doi.org/10.3390/ijms151120518>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V., & Latz, E. (2009). Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology*, 183(2), 787–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>
- Bellinghausen, I., Weigmann, B., Zevallos, V., Maxeiner, J., Reißig, S., Waisman, A., Schuppan, D., & Saloga, J. (2019). Wheat amylase-trypsin inhibitors exacerbate intestinal and airway allergic immune responses in humanized mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(1), 201-212.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.041>
- Benahmed, M., Meresse, B., Arnulf, B., Barbe, U., Mention, J. J., Verkarre, V., Allez, M., Cellier, C., Hermine, O., & Cerf-Bensussan, N. (2007). Inhibition of TGF- $\beta$  Signaling by IL-15: A New Role for IL-15 in the Loss of Immune Homeostasis in Celiac Disease. *Gastroenterology*, 132(3), 994–1008. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.025>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J. J., Stencel-, J. E., Ikizler, M., Discepolo, V., Meisel, M., Kim, S. M., & Lawrence, I. (2017). *Reovirus infection breaks tolerance to dietary antigens and promotes development of celiac disease.*
- Brown, N. K., Guandalini, S., Semrad, C., & Kupfer, S. S. (2019). A clinician’s guide to celiac disease HLA genetics. *American Journal of Gastroenterology*, 114(10), 1587–1592. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000310>
- Cade, C. E., & Clark, A. C. (2015). Caspases-key players in apoptosis. *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances*, 31–51. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4_2)
- Calvanese, L., Nanayakkara, M., Aitoro, R., Sanseverino, M., Tornesello, A. L., Falcigno, L., D’Auria, G., & Barone, M. V. (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). <https://doi.org/10.1002/psc.3161>
- Casson, C. N., Yu, J., Reyes, V. M., Taschuk, F. O., Yadav, A., Copenhaver, A. M., Nguyen, H. T., Collman, R. G., & Shin, S. (2015). Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(21), 6688–6693. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421699112>
- Chaitanya, G. V., Alexander, J. S., & Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>
- Ch’en, I. L., Beisner, D. R., Degterev, A., Lynch, C., Yuan, J., Hoffmann, A., & Hedrick, S. M. (2008). Antigen-mediated T cell expansion regulated by parallel pathways of death.



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17463–17468. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808043105>
- Ch'en, I. L., Tsau, J. S., Molkentin, J. D., Komatsu, M., & Hedrick, S. M. (2011). Mechanisms of necroptosis in T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 208(4), 633–641. <https://doi.org/10.1084/jem.20110251>
- Chen, X., Liu, G., Yuan, Y., Wu, G., Wang, S., & Yuan, L. (2019). NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Death and Disease*, 10(12), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2157-1>
- Cheravsky, A. C., Rubio, A. E., Vanzulli, S., Rubinstein, N., de Rosa, S., & Fainboim, L. (2002). Evidences of the involvement of Bak, a member of the Bcl-2 family of proteins, in active coeliac disease. *Autoimmunity*, 35(1), 29–37. <https://doi.org/10.1080/08916930290005945>
- Cheung, K. T., Sze, D. M., Chan, K. H., & Leung, P. H. (2017). Involvement of Caspase-4 in IL-1 beta Production and Pyroptosis in Human Macrophages During Dengue Virus Infection. *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.044>
- Chirido, F. G., Auricchio, S., Troncone, R., & Barone, M. V. (2021). The gliadin p31–43 peptide: Inducer of multiple proinflammatory effects. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 358, pp. 165–205). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.10.003>
- Christgen, S., Zheng, M., Kesavardhana, S., Karki, R., Malireddi, R. K. S., Banoth, B., Place, D. E., Briard, B., Sharma, B. R., Tuladhar, S., Samir, P., Burton, A., & Kanneganti, T. D. (2020). Identification of the PANoptosome: A Molecular Platform Triggering Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00237>
- Ciccocioppo, R., di Sabatino, A., Bauer, M., della Riccia, D. N., Bizzini, F., Biagi, F., Cifone, M. G., Corazza, G. R., & Schuppan, D. (2005). Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Laboratory Investigation*, 85(3), 397–407. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700225>
- Ciccocioppo, R., di Sabatino, A., Parroni, R., Muzi, P., D'Alò, S., Ventura, T., Pistoia, M. A., Cifone, M. G., & Corazza, G. R. (2001). Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease. *American Journal of Clinical Pathology*, 115(4), 494–503. <https://doi.org/10.1309/UV54-BHP3-A66B-0QUD>
- Ciccocioppo, R., Finamore, A., Ara, C., di Sabatino, A., Mengheri, E., & Corazza, G. R. (2006). Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *American Journal of Clinical Pathology*, 125(4), 502–511. <https://doi.org/10.1309/DTYRA91G8R0KTM8M>
- Clemente, M. G., de Virgiliis, S., Kang, J. S., Macatagney, R., Musu, M. P., di Pierro, M. R., Drago, S., Congia, M., & Fasano, A. (2003). Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, 52(2), 218–223. <https://doi.org/10.1136/gut.52.2.218>
- Coll, R. C., Robertson, A. A. B., Chae, J. J., Higgins, S. C., Dungan, L. S., Munoz-Planillo, R., Monks, B. G., Croker, D. E., Sutton, C. E., Stutz, A., Nunez, G., Latz, E., Kastner, D. L., Mills, K. H. G., Masters, S. L., Schroder, K., Cooper, M. A., & O'Neill, L. A. J. (2014). MCC950 is a potent and specific inhibitor of the NLRP3 inflammasome and a novel potential therapeutic for NLRP3 driven diseases. *Cytokine*, 70(1), 35. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.07.037>

- Comincini, S., Manai, F., Meazza, C., Pagani, S., Martinelli, C., Pasqua, N., Pelizzo, G., Biggiogera, M., & Bozzola, M. (2017). Identification of autophagy-related genes and their regulatory miRNAs associated with celiac disease in children. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020391>
- Deng, M., Tang, Y., Li, W., Wang, X., Zhang, R., Zhang, X., Zhao, X., Liu, J., Tang, C., Liu, Z., Huang, Y., Peng, H., Xiao, L., Tang, D., Scott, M. J., Wang, Q., Liu, J., Xiao, X., Watkins, S., ... Lu, B. (2018). The Endotoxin Delivery Protein HMGB1 Mediates Caspase-11-Dependent Lethality in Sepsis. *Immunity*, *49*(4), 740-753.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.016>
- di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., D'Alò, S., Parroni, R., Millimaggi, D., Cifone, M. G., & Corazza, G. R. (2001). Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*, *49*(3), 380–386. <https://doi.org/10.1136/gut.49.3.380>
- di Sabatino, A., Miceli, E., Dhaliwal, W., Biancheri, P., Salerno, R., Cantoro, L., Vanoli, A., de Vicenzi, M., del Vecchio Blanco, C., MacDonald, T. T., & Corazza, G. R. (2008). Distribution, proliferation, and function of paneth cells in uncomplicated and complicated adult celiac disease. *American Journal of Clinical Pathology*, *130*(1), 34–42. <https://doi.org/10.1309/5ADNAR4VN11TTKQ6>
- di Sabatino, A., Pickard, K. M., Gordon, J. N., Salvati, V., Mazzarella, G., Beattie, R. M., Vossenkaemper, A., Rovedatti, L., Leakey, N. A. B., Croft, N. M., Troncone, R., Corazza, G. R., Stagg, A. J., Monteleone, G., & MacDonald, T. T. (2007). Evidence for the Role of Interferon-alfa Production by Dendritic Cells in the Th1 Response in Celiac Disease. *Gastroenterology*, *133*(4), 1175–1187. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.018>
- Dieli-Crimi, R., Cénit, M. C., & Núñez, C. (2015). The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. In *Journal of Autoimmunity* (Vol. 64, pp. 26–41). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.003>
- Dörfel, M. J., & Huber, O. (2012). Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/807356>
- Edelblum, K. L., Shen, L., Weber, C. R., Marchiando, A. M., Clay, B. S., Wang, Y., Prinz, I., Malissen, B., Sperling, A. I., & Turner, J. R. (2012). Dynamic migration of  $\gamma\delta$  intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(18), 7097–7102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112519109>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Ewen, C. L., Kane, K. P., & Bleackley, R. C. (2012). A quarter century of granzymes. *Cell Death and Differentiation*, *19*(1), 28–35. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.153>
- Fasano, A. (2011). *Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2008.-The>
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J. W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., & Alnemri, E. S. (2007). The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, *14*(9), 1590–1604. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402194>

- Ferranti, P., Mamone, G., Picariello, G., & Addeo, F. (2007). Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(12), 1531–1548. <https://doi.org/10.1002/jms.1361>
- Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 124(4), 619–626. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.619>
- Fritsch, M., Günther, S. D., Schwarzer, R., Albert, M. C., Schorn, F., Werthenbach, J. P., Schiffmann, L. M., Stair, N., Stocks, H., Seeger, J. M., Lamkanfi, M., Krönke, M., Pasparakis, M., & Kashkar, H. (2019). Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 575(7784), 683–687. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1770-6>
- Frossi, B., Mion, F., Tripodo, C., Colombo, M. P., & Pucillo, C. E. (2017). Rheostatic Functions of Mast Cells in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses. *Trends in Immunology*, 38(9), 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.001>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. v., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J., & Ghosh, S. (2020). Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *Journal of the Endocrine Society*, 4(2), 1–15. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz039>
- Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Vari, R., D'Archivio, M., Straface, E., Masella, R., Malorni, W., & de Vincenzi, M. (2003). Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Letters*, 540(1–3), 117–124. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00236-9)
- Gómez Castro, M. F., Miculán, E., Herrera, M. G., Ruera, C., Perez, F., Prieto, E. D., Barrera, E., Pantano, S., Carasi, P., & Chirido, F. G. (2019). P31-43 gliadin peptide forms oligomers and induces NLRP3 inflammasome/caspase 1-dependent mucosal damage in small intestine. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00031>
- Gomez, J. C., Selvaggio, G. S., Pizarro, B., la Motta, G., de Barrio, S., Castelletto, R., Echeverría, R., Sugai, E., Vazquez, H., Mauriño, E., & Bai, J. C. (2001). *Prevalence of Celiac Disease in Argentina: Screening of an Adult Population in the La Plata Area*.
- Gong, W., Shi, Y., & Ren, J. (2020). Research progresses of molecular mechanism of pyroptosis and its related diseases. *Immunobiology*, 225(2), 151884. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.11.019>
- Gordeziani, M., Adamia, G., Khatisashvili, G., & Gigolashvili, G. (2017). Programmed cell self-liquidation (apoptosis). *Annals of Agrarian Science*, 15(1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.11.001>
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal physiology and function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 239. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_118](https://doi.org/10.1007/164_2016_118)

- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 124, Issue 1, pp. 3–20). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Grossmann, J., Maxson, J. M., Whitacre, C. M., Orosz, D. E., Berger, N. A., Fiocchi, C., & Levine, A. D. (1998). New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *American Journal of Pathology*, *153*(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65545-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65545-9)
- Gudipaty, S. A., & Rosenblatt, J. (2017). Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 67, pp. 132–140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.05.010>
- Günther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M. J., Hedrick, S. M., Tenzer, S., Neurath, M. F., & Becker, C. (2011). Caspase-8 regulates TNF- $\alpha$ -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, *477*(7364), 335–339. <https://doi.org/10.1038/nature10400>
- Günther, C., Neumann, H., Neurath, M. F., & Becker, C. (2013). Apoptosis, necrosis and necroptosis: Cell death regulation in the intestinal epithelium. In *Gut* (Vol. 62, Issue 7, pp. 1062–1071). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301364>
- Günther, C., Ruder, B., Stolzer, I., Dorner, H., He, G. W., Chiriac, M. T., Aden, K., Strigli, A., Bittel, M., Zeissig, S., Rosenstiel, P., Atreya, R., Neurath, M. F., Wirtz, S., & Becker, C. (2019). Interferon Lambda Promotes Paneth Cell Death Via STAT1 Signaling in Mice and Is Increased in Inflamed Ileal Tissues of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *157*(5), 1310-1322.e13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.031>
- Gutierrez, K. D., Davis, M. A., Daniels, B. P., Olsen, T. M., Ralli-Jain, P., Tait, S. W. G., Gale, M., Oberst, A., Ralli-Jain, P., Tait, S. W. G., Gale, M., & Oberst, A. (2018). MLKL Activation Triggers NLRP3-Mediated Processing and Release of IL-1  $\beta$  Independently of Gasdermin-D. *The Journal of Immunology*, *198*(5), 2156–2164. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601757>
- Hakim, S. A., & Abd El-Kareem, D. (2021). Evaluation of crypt apoptotic bodies and apoptotic indices in pediatric celiac disease by routine staining and H2AX immunostaining. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *35*. <https://doi.org/10.1177/20587384211026791>
- Hall, P. A., Coates, P. J., Ansari, B., & Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: The importance of apoptosis. *Journal of Cell Science*, *107*(12), 3569–3577.
- Harris, K., Fasano, A., & Mann, D. (2008). IL-1 regulates the IL-23 response to wheat gliadin, the etiologic agent of Celiac Disease. *Nature Precedings*. <https://doi.org/10.1038/npre.2008.1882.1>
- Harris, K. M., Fasano, A., & Mann, D. L. (2008). IL-1 regulates the IL-23 response to wheat gliadin, the etiologic agent of Celiac Disease. *Nature Precedings*. <https://doi.org/10.1038/npre.2008.1882.1>
- Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1778, Issue 3, pp. 660–669). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>

- Herrera, M. G., Gómez Castro, M. F., Prieto, E., Barrera, E., Doderó, V. I., Pantano, S., & Chirido, F. (2019). Structural conformation and self-assembly process of p31-43 gliadin peptide in aqueous solution. Implications for celiac disease. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.15109>
- Heyman, M., Abed, J., Lebreton, C., & Cerf-Bensussan, N. (2012). Intestinal permeability in coeliac disease: Insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. In *Gut* (Vol. 61, Issue 9, pp. 1355–1364). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300327>
- Honda, K., & Takeda, K. (2009). Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. In *Mucosal Immunology* (Vol. 2, Issue 3, pp. 187–196). <https://doi.org/10.1038/mi.2009.8>
- Husby, S., & Murray, J. A. (2014). Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 655–663). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.162>
- Husby, S., Murray, J. A., & Katzka, D. A. (2019). AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease—Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review. In *Gastroenterology* (Vol. 156, Issue 4, pp. 885–889). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.010>
- Iacomino, G., Fierro, O., D’Auria, S., Picariello, G., Ferranti, P., Liguori, C., Addeo, F., & Mamone, G. (2013). Structural analysis and Caco-2 cell permeability of the celiac-toxic A-gliadin peptide 31-55. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(5), 1088–1096. <https://doi.org/10.1021/jf3045523>
- Ianiro, G., Gasbarrini, A., & Cammarota, G. (2013). Endoscopic tools for the diagnosis and evaluation of celiac disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 19, Issue 46, pp. 8562–8570). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8562>
- Iversen, R., Amundsen, S. F., Kleppa, L., du Pré, M. F., Stammaes, J., & Sollid, L. M. (2020). Evidence That Pathogenic Transglutaminase 2 in Celiac Disease Derives From Enterocytes. *Gastroenterology*, 159(2), 788–790. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.018>
- Izcue, A., Coombes, J. L., & Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 27, pp. 313–338). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132657>
- Jabri, B., & Abadie, V. (2015). IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 771–783). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3919>
- James, O. J., Vandereyken, M., Marchingo, J. M., Singh, F., Bray, S. E., Wilson, J., Love, A. G., & Swamy, M. (2021). IL-15 and PIM kinases direct the metabolic programming of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24473-2>
- Jarry, A., Malard, F., Bou-Hanna, C., Meurette, G., Mohty, M., Mosnier, J. F., Labois, C. L., & Bossard, C. (2017). Interferon-Alpha Promotes Th1 Response and Epithelial Apoptosis via Inflammasome Activation in Human Intestinal Mucosa. *Cmgh*, 3(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.09.007>
- Jeong, E., & Lee, J. Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Medical Journal*, 52(3), 379–392. <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.3.379>

- Jiménez-Dalmaroni, M. J., Gerswhin, M. E., & Adamopoulos, I. E. (2016). The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 15, Issue 1, pp. 1–8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.08.009>
- Jinno, Y., Ohtani, H., Nakamura, S., Oki, M., Maeda, K., Fukushima, K., Nagura, H., Oshitani, N., Matsumoto, T., & Arakawa, T. (2006). Infiltration of CD19+ plasma cells with frequent labeling of Ki-67 in corticosteroid-resistant active ulcerative colitis. *Virchows Archiv*, 448(4), 412–421. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0136-7>
- Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 639–649). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M., & Miao, E. A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nature Reviews Immunology*, 17(3), 151–164. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.147>
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nature Immunology*, 9(4), 361–368. <https://doi.org/10.1038/ni1569>
- Kai, Y. (2021). Intestinal villus structure contributes to even shedding of epithelial cells. *Biophysical Journal*, 120(4), 699–710. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.01.003>
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Walle, L. vande, Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., Zhang, J., Lee, W. P., Roose-Girma, M., & Dixit, V. M. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 479(7371), 117–121. <https://doi.org/10.1038/nature10558>
- Kearney, C. J., & Martin, S. J. (2017). An Inflammatory Perspective on Necroptosis. *Molecular Cell*, 65(6), 965–973. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.024>
- Kesavardhana, S., & Kanneganti, T. D. (2017). Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. In *International Immunology* (Vol. 29, Issue 5, pp. 201–210). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx018>
- Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S., & Kanneganti, T.-D. (2020). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annual Review of Immunology*, 38(1), 567–595. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-073119-095439>
- Khan, I., Yousif, A., Chesnokov, M., Hong, L., & Chefetz, I. I. (2021). A decade of cell death studies: Breathing new life into necroptosis. *Pharmacology and Therapeutics*, 220, 107717. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107717>
- Kim, Y. K., Shin, J. S., & Nahm, M. H. (2016). NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. *Yonsei Medical Journal*, 57(1), 5–14. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>
- Knodler, L. A., Crowley, S. M., Sham, H. P., Yang, H., Wrangle, M., Ma, C., Ernst, R. K., Steelmortimer, O., Celli, J., & Vallance, B. A. (2014). Short Article Noncanonical Inflammasome Activation of Caspase-4 / Caspase-11 Mediates Epithelial Defenses against Enteric Bacterial Pathogens. *Cell Host and Microbe*, 16(2), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.002>
- Krug, S. M., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 36, pp. 166–176). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.002>

- Kumar, V., Jarzabek-Chorzelska, M., Sulej, J., Karnewska, K., Farrell, T., & Jablonska, S. (2002). Celiac disease and immunoglobulin A deficiency: How effective are the serological methods of diagnosis? *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1295–1300. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1295-1300.2002>
- Kuriakose, T., & Kanneganti, T. D. (2018). Gasdermin D Flashes an Exit Signal for IL-1. In *Immunity* (Vol. 48, Issue 1, pp. 1–3). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.003>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 137–161. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155745>
- Lee, S. H., Kwon, J. Y., Moon, J., Choi, J., Jhun, J., Jung, K., Cho, K. H., Darlami, O., Lee, H. H., Jung, E. S., Shin, D. Y., Lee, B. I., & Cho, M. I. (2020). Inhibition of RIPK3 pathway attenuates intestinal inflammation and cell death of inflammatory bowel disease and suppresses necroptosis in peripheral mononuclear cells of ulcerative colitis patients. *Immune Network*, 20(2), 1–15. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e16>
- Lee, S. J., Karki, R., Wang, Y., Nguyen, L. N., Kalathur, R. C., & Kanneganti, T. D. (2021). AIM2 forms a complex with pyrin and ZBP1 to drive PANoptosis and host defence. *Nature*, 597(7876), 415–419. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03875-8>
- Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E. A., Makharia, G. K., Mearin, M. L., Murray, J. A., Verdu, E. F., & Kaukinen, K. (2019). Coeliac disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0054-z>
- Liu, G., Chen, X., Wang, Q., & Yuan, L. (2020). NEK7: A potential therapy target for NLRP3-related diseases. In *BioScience Trends* (Vol. 14, Issue 2, pp. 74–82). International Advancement Center for Medicine and Health Research Co., Ltd. <https://doi.org/10.5582/bst.2020.01029>
- Liu, Y., Liu, T., Lei, T., Zhang, D., Du, S., Girani, L., Qi, D., Lin, C., Tong, R., & Wang, Y. (2019). RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(3), 771–786. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4244>
- Long, J. S., & Ryan, K. M. (2012). New frontiers in promoting tumour cell death: Targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene*, 31(49), 5045–5060. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.7>
- Lubkov, V., & Bar-Sagi, D. (2014). E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic cell extrusion. *Current Biology*, 24(8), 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.057>
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C. P., Leonard, J. N., Lundin, K. E. A., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F., & Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43–52. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301346>
- Ludvigsson, J. F., & Murray, J. A. (2019). Epidemiology of Celiac Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 48(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2018.09.004>
- Lueschow, S. R., & McElroy, S. J. (2020). The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00587>

- Maiuri, L., Ciacci, C., Raia, V., Vacca, L., Ricciardelli, I., Raimondi, F., Auricchio, S., Quaratino, S., & Londei, M. (2001). FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut*, *48*(3), 418–424. <https://doi.org/10.1136/gut.48.3.418>
- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quaratino S, L. M. (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *The LANCET*, *362*, 30–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13803-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13803-2)
- Maiuri, L., Vilella, V. R., Raia, V., & Kroemer, G. (2019). The gliadin-CFTR connection: New perspectives for the treatment of celiac disease. *Italian Journal of Pediatrics*, *45*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13052-019-0627-9>
- Manavalan, J. S., Hernandez, L., Shah, J. G., Konikkara, J., Naiyer, A. J., Lee, A. R., Ciaccio, E., Minaya, M. T., Green, P. H. R., & Bhagat, G. (2010). Serum cytokine elevations in celiac disease: Association with disease presentation. *Human Immunology*, *71*(1), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.09.351>
- Mangan, M. S. J., Olhava, E. J., Roush, W. R., Seidel, H. M., Glick, G. D., & Latz, E. (2018). Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(8), 588–606. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97>
- Manti, S., Cuppari, C., Tardino, L., Parisi, G., Spina, M., Salpietro, C., & Leonardi, S. (2017). HMGB1 as a new biomarker of celiac disease in children: A multicenter study. *Nutrition*, *37*, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.12.011>
- 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'). In *Gastroenterology* (Vol. 102, Issue 1, pp. 330–354). [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91819-P](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91819-P)
- Matikainen, S., Nyman, T. A., & Cypriak, W. (2020). Function and Regulation of Noncanonical Caspase-4/5/11 Inflammasome. *The Journal of Immunology*, *204*(12), 3063–3069. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000373>
- Mayassi, T., Ladell, K., Gudjonson, H., McLaren, J. E., Shaw, D. G., Tran, M. T., Rokicka, J. J., Lawrence, I., Grenier, J. C., van Unen, V., Ciszewski, C., Dimaano, M., Sayegh, H. E., Kumar, V., Wijmenga, C., Green, P. H. R., Gokhale, R., Jericho, H., Semrad, C. E., ... Jabri, B. (2019). Chronic Inflammation Permanently Reshapes Tissue-Resident Immunity in Celiac Disease. *Cell*, *176*(5), 967–981.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.039>
- Mazgaen, L., & Gurung, P. (2020). Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>
- Medzhitov, R. (2001). *Medzhitov TLRs*. 1(November).
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. In *Mucosal Immunology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 247–259). <https://doi.org/10.1038/mi.2010.5>
- Meresse, B., Curran, S. A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E., Winchester, R. J., Braud, V., Lanier, L. L., Geraghty, D. E., Green, P. H., Guandalini, S., & Jabri, B. (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(5), 1343–1355. <https://doi.org/10.1084/jem.20060028>



- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, *114*(2), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00521-X)
- Monguzzi, E., Marabini, L., Elli, L., Vaira, V., Ferrero, S., Ferretti, F., Branchi, F., Gaudio, G., Scricciolo, A., Lombardo, V., Doneda, L., & Roncoroni, L. (2019). Gliadin effect on the oxidative balance and DNA damage: An in-vitro, ex-vivo study. *Digestive and Liver Disease*, *51*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.06.020>
- Montalto, M., Cuoco, L., Ricci, R., Maggiano, N., Vecchio, F. M., & Gasbarrini, G. (2002). Immunohistochemical analysis of ZO-1 in the duodenal mucosa of patients with untreated and treated celiac disease. *Digestion*, *65*(4), 227–233. <https://doi.org/10.1159/000063817>
- Mora, M., Litwin, N., Toca, M. D. C., Azcona, M. I., Neffa, R. S., Battiston, F., Solaegui, M., Ortiz, G., Wagener, M., Olivera, J., Marchisone, S., Oropeza, G., Bastianelli, C., González, A., & Rezzónico, G. (2012). Prevalence of celiac disease: A multicenter trial in pediatric population from five urban districts of Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría*, *110*(6), 490–496. <https://doi.org/10.5546/aap.2012.490>
- Moretti, S., Mrakic-Sposta, S., Roncoroni, L., Vezzoli, A., Dellanoce, C., Monguzzi, E., Branchi, F., Ferretti, F., Lombardo, V., Doneda, L., Scricciolo, A., & Elli, L. (2018). Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease article. *Clinical and Translational Gastroenterology*, *9*(6). <https://doi.org/10.1038/s41424-018-0031-6>
- Muniz, L. R., Knosp, C., & Yeretssian, G. (2012). Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00310>
- Negróni, A., Colantoni, E., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2020). Necroptosis in intestinal inflammation and cancer: New concepts and therapeutic perspectives. *Biomolecules*, *10*(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom10101431>
- Negróni, A., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2015). Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators of Inflammation*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/250762>
- Newton, K., Wickliffe, K. E., Maltzman, A., Dugger, D. L., Reja, R., Zhang, Y., Roose-Girma, M., Modrusan, Z., Sagolla, M. S., Webster, J. D., & Dixit, V. M. (2019). Activity of caspase-8 determines plasticity between cell death pathways. *Nature*, *575*(7784), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1752-8>
- Olaussen, R. W., Johansen, F. E., Lundin, K. E. A., Jahnsen, J., Brandtzaeg, P., & Farstad, I. N. (2002). Interferon- $\gamma$ -secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, *56*(6), 652–664. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01195.x>
- Pabst, O., & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. In *Mucosal Immunology* (Vol. 5, Issue 3, pp. 232–239). <https://doi.org/10.1038/mi.2012.4>
- Palová-Jelínková, L., Dáňová, K., Drašarová, H., Dvořák, M., Funda, D. P., Fundová, P., Kotrbová-Kozak, A., Černá, M., Kamanová, J., Martin, S. F., Freudenberg, M., & Tučková, L. (2013). Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1 $\beta$  via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway and an NLRP3 Inflammasome Activation. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062426>

- Paolella, G., Lepretti, M., Martucciello, S., Nanayakkara, M., Auricchio, S., Esposito, C., Barone, M. V., & Caputo, I. (2018). The toxic alpha-gliadin peptide 31–43 enters cells without a surface membrane receptor. *Cell Biology International*, 42(1), 112–120. <https://doi.org/10.1002/cbin.10874>
- Parzanese, I., Qehajaj, D., Patrinicola, F., Aralica, M., Chiriva-Internati, M., Stifter, S., Elli, L., & Grizzi, F. (2017). Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(2), 27. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i2.27>
- Patterson, A. M., & Watson, A. J. M. (2017). Deciphering the complex signaling systems that regulate intestinal epithelial cell death processes and shedding. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00841>
- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E. L., Wising, C., Johansson, M. E. v, & Hansson, G. C. (2014). *The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system.*
- Peña, A. S. (2015). What is the best histopathological classification for celiac disease? Does it matter? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 8(4), 239–243.
- Perez, F., Ruera, C. N., Miculan, E., Carasi, P., & Chirido, F. G. (2021). Programmed cell death in the small intestine: Implications for the pathogenesis of celiac disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147426>
- Perez, F., Ruera, C. N., Miculan, E., Carasi, P., Dubois-Camacho, K., Garbi, L., Guzman, L., Hermoso, M. A., & Chirido, F. G. (2020). IL-33 Alarmin and Its Active Proinflammatory Fragments Are Released in Small Intestine in Celiac Disease. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581445>
- Picascia, S., Sidney, J., Camarca, A., Mazzarella, G., Giardullo, N., Greco, L., Auricchio, R., Auricchio, S., Troncone, R., Sette, A., & Gianfrani, C. (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), 1838–1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601208>
- Pietrzak, B., Tomela, K., Olejnik-Schmidt, A., Mackiewicz, A., & Schmidt, M. (2020). Secretory iga in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21239254>
- Pietz, G. R., Hedberg, M., Sjö Berg, V., Sandström, M. O., Hernell, O., Hammarström, M. S., & Hammarström, M.-L. (2017). *Immunopathology of childhood celiac disease —Key role of intestinal epithelial cells.* 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185025>
- Pizzuti, D., Bortolami, M., Mazzon, E., Buda, A., Guariso, G., D’Odorico, A., Chiarelli, S., D’Incà, R., de Lazzari, F., & Martines, D. (2004). Transcriptional downregulation of tight junction protein ZO-1 in active coeliac disease is reversed after a gluten-free diet. *Digestive and Liver Disease*, 36(5), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2004.01.013>
- Platt, N., Shepherd, D., Weng, Y., Churchill, G. C., Galione, A., & Platt, F. M. (2022). Release of acidic store calcium is required for effective priming of the NLRP3 inflammasome. *BioRxiv*, 2022.01.06.475262. <https://doi.org/10.1101/2022.01.06.475262>
- Pohjanen, V. M., Kokkonen, T. S., Arvonen, M., Augustin, M. A., Patankar, M., Turunen, S., Vähäsalo, P., Karttunen, T. J., POHJANEN, Pohjanen, V. M., Kokkonen, T. S., Arvonen,

- M., Augustin, M. A., Patankar, M., Turunen, S., Vähäsalo, P., & Karttunen, T. J. (2013). Decreased expression of protease inhibitor 9, a granzyme B inhibitor, in celiac disease: A potential mechanism in enterocyte destruction and villous atrophy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 26(4), 897–905. <https://doi.org/10.1177/039463201302600408>
- Potten, C. S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation II. Intestinal apoptosis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273(2 36-2), 253–257. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.273.2.g253>
- Povea-Cabello, S., Oropesa-Ávila, M., de la Cruz-Ojeda, P., Villanueva-Paz, M., De La Mata, M., Suárez-Rivero, J. M., Álvarez-Córdoba, M., Villalón-García, I., Cotán, D., Ybot-González, P., & Sánchez-Alcázar, J. A. (2017). Dynamic reorganization of the cytoskeleton during apoptosis: The two coffins hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112393>
- Primiano, M. J., Lefker, B. A., Bowman, M. R., Bree, A. G., Hubeau, C., Bonin, P. D., Mangan, M., Dower, K., Monks, B. G., Cushing, L., Wang, S., Guzova, J., Jiao, A., Lin, L.-L., Latz, E., Hepworth, D., & Hall, J. P. (2016). Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. *The Journal of Immunology*, 197(6), 2421–2433. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600035>
- Qiu, S., Liu, J., & Xing, F. (2017). ‘ Hints ’ in the killer protein gasdermin D : unveiling the secrets of gasdermins driving cell death. 24(4), 588–596. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.24>
- Quiros, M., & Nusrat, A. (2014). RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the Epithelial Apical Junctional Complex. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 36, pp. 194–203). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.003>
- Rao, R. (2009). Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 62–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04054.x>
- Rashid, M., & Lee, J. (2016). Serologic testing in celiac disease Practical guide for clinicians. *Canadian Family Physician*, 62(1), 38–43.
- Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S. M., Oelrich, B., Schulzke, J. D., Amasheh, S., Günzel, D., & Fromm, M. (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of Cell Science*, 123(11), 1913–1921. <https://doi.org/10.1242/jcs.060665>
- Rothem, L., Hartman, C., Dahan, A., Lachter, J., Eliakim, R., & Shamir, R. (2007). Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 730–739. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.003>
- Rovira-Llopis, S., Apostolova, N., Bañuls, C., Muntané, J., Rocha, M., & Victor, V. M. (2018). Mitochondria, the NLRP3 inflammasome, and sirtuins in type 2 diabetes: New therapeutic targets. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(8), 749–791. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7313>
- Ruera, C. N., Miculán, E., Pérez, F., Ducca, G., Carasi, P., & Chirido, F. G. (2021). Sterile inflammation drives multiple programmed cell death pathways in the gut. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(1), 211–221. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0820-660R>

- Rutering, J., Ilmer, M., Recio, A., Coleman, M., Vykoukal, J., Alt, E., & Orleans, N. (2015). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*, 5(6), 1–8. <https://doi.org/10.1038/nature10999>. Crowding
- Sabatino, A. di, Ciccocioppo, R., D'Alò, S., Parroni, R., Millimaggi, D., Cifone, M. G., Corazza, G. R., di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., D'Alò, S., Parroni, R., Millimaggi, D., Cifone, M. G., & Corazza, G. R. (2001). Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*, 49(3), 380–386. <https://doi.org/10.1136/gut.49.3.380>
- Salim, S. Y., & Söderholm, J. D. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 17, Issue 1, pp. 362–381). <https://doi.org/10.1002/ibd.21403>
- Samir, P., Malireddi, R. K. S., & Kanneganti, T. D. (2020). The PANoptosome: A Deadly Protein Complex Driving Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00238>
- Samson, A. L., Zhang, Y., Geoghegan, N. D., Gavin, X. J., Davies, K. A., Mlodzianoski, M. J., Whitehead, L. W., Frank, D., Garnish, S. E., Fitzgibbon, C., Hempel, A., Young, S. N., Jacobsen, A. v., Cawthorne, W., Petrie, E. J., Faux, M. C., Shield-Artin, K., Lalaoui, N., Hildebrand, J. M., ... Murphy, J. M. (2020). MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16887-1>
- Sarhan, M., Land, W. G., Tonnus, W., Hugo, C. P., & Linkermann, A. (2018). Origin and Consequences of Necroinflammation. *Physiol Rev*, 98, 727–780. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2016>.-When
- Schmid-Burgk, J. L., Gaidt, M. M., Schmidt, T., Ebert, T. S., Bartok, E., & Hornung, V. (2015). Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *European Journal of Immunology*, 45(10), 2911–2917. <https://doi.org/10.1002/eji.201545523>
- Schumann, M., Siegmund, B., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2017). Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cmgh*, 3(2), 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.006>
- Schwarzer, R., Laurien, L., & Pasparakis, M. (2020). New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.004>
- Scott, B. B., Goodall, A., Stephenson, P., & Jenkins, D. (1984). Small intestinal plasma cells in coeliac disease. *Gut*, 25(1), 41–46. <https://doi.org/10.1136/gut.25.1.41>
- Shalimar, Das, P., Sreenivas, V., Gupta, S. D., Panda, S. K., & Makharia, G. K. (2013). Mechanism of villous atrophy in celiac disease: Role of apoptosis and epithelial regeneration. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(9), 1262–1269. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0354-OA>
- Sharif, H., Wang, L., Wang, W. L., Magupalli, V. G., Andreeva, L., Qiao, Q., Hauenstein, A. v., Wu, Z., Núñez, G., Mao, Y., & Wu, H. (2019). Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature*, 570(7761), 338–343. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1295-z>

- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V., & Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823-836.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>
- Sollid, L. M., & Jabri, B. (2013). Triggers and drivers of autoimmunity: Lessons from coeliac disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 294–302). <https://doi.org/10.1038/nri3407>
- Sollid, L. M., Markussen, G., Ek, J., Gjerde, H., Vartdal, F., & Thorsby, E. (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ  $\alpha/\beta$  heterodimer. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 169, Issue 1). <https://doi.org/10.1084/jem.169.1.345>
- Song, N., & Li, T. (2018). Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02305>
- Stoven, S., Murray, J. A., & Marietta, E. v. (2013). Latest in vitro and in vivo models of celiac disease. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(4), 445–457. <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.761203>
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., & Flavell, R. A. (2007). The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(2), 259–264. <https://doi.org/10.1189/jlb.1206755>
- Swanson, K. v., Deng, M., & Ting, J. P. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, 19(8), 477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tan, G., Huang, C., Chen, J., Chen, B., & Zhi, F. (2021). Gasdermin-E-mediated pyroptosis participates in the pathogenesis of Crohn's disease by promoting intestinal inflammation. *Cell Reports*, 35(11), 109265. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109265>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Tarlton, N. J., Green, C. M., Lazarus, N. H., Rott, L., Wong, A. P., Abramson, O. N., Bremer, M., Butcher, E. C., & Abramson, T. (2012). Plasmablast frequency and trafficking receptor expression are altered in pediatric ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(12), 2381–2391. <https://doi.org/10.1002/ibd.22962>
- Tartey, S., & Kanneganti, T. D. (2020). Inflammasomes in the pathophysiology of autoinflammatory syndromes. *Journal of Leukocyte Biology*, 107(3), 379–391. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR0919-191R>
- Thomas, K. E., Sapone, A., Fasano, A., & Vogel, S. N. (2006). Gliadin Stimulation of Murine Macrophage Inflammatory Gene Expression and Intestinal Permeability Are MyD88-Dependent: Role of the Innate Immune Response in Celiac Disease. *The Journal of Immunology*, 176(4), 2512–2521. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2512>
- Thoo, L., Noti, M., & Krebs, P. (2019). Keep calm: the intestinal barrier at the interface of peace and war. In *Cell Death and Disease* (Vol. 10, Issue 11). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2086-z>

- Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., & Nakano, H. (2015). FLIP the switch: Regulation of apoptosis and necroptosis by cFLIP. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 30321–30341. <https://doi.org/10.3390/ijms161226232>
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 11, pp. 799–809). <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell*, *126*(4), 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.043>
- van Leeuwen, M. A., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Raatgeep, H. C., de Ruiter, L. F., de Krijger, R. R., Groeneweg, M., Escher, J. C., & Samsom, J. N. (2013). Increased production of interleukin-21, but not interleukin-17A, in the small intestine characterizes pediatric celiac disease. *Mucosal Immunology*, *6*(6), 1202–1213. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.19>
- van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. In *Immunity* (Vol. 50, Issue 6, pp. 1352–1364). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. In *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 821–834). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Venuprasad, K., & Theiss, A. L. (2021). NLRP6 in host defense and intestinal inflammation. *Cell Reports*, *35*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109043>
- Villalta, D., Tonutti, E., Prause, C., Koletzko, S., Uhlig, H. H., Vermeersch, P., Bossuyt, X., Stern, M., Laass, M. W., Ellis, J. H., Ciclitira, P. J., Richter, T., Daehrich, C., Schlumberger, W., & Mothes, T. (2010). IgG antibodies against deamidated gliadin peptides for diagnosis of celiac disease in patients with IgA deficiency. *Clinical Chemistry*, *56*(3), 464–468. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.128132>
- Walsh, D., McCarthy, J., O’Driscoll, C., & Melgar, S. (2013). Pattern recognition receptors—Molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *24*(2), 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.09.003>
- Wang, F., Wang, F., Zou, Z., Liu, D., Wang, J., & Su, Y. (2011). Active deformation of apoptotic intestinal epithelial cells with adhesion-restricted polarity contributes to apoptotic clearance. *Laboratory Investigation*, *91*(3), 462–471. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.182>
- Wang, X., Hao, G. L., Wang, B. Y., Gao, C. C., Wang, Y. X., Li, L. S., & Xu, J. D. (2019). Function and dysfunction of plasma cells in intestine. *Cell and Bioscience*, *9*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0288-9>
- Watanabe, D., Guo, Y., & Kamada, N. (2021). Interaction between the inflammasome and commensal microorganisms in gastrointestinal health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, *13*(12), 1–11. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013452>
- Weinberg, S. E., Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2015). Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*, *42*(3), 406–417. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.002>
- Welz, P. S., Wullaert, A., Vlantis, K., Kondylis, V., Fernández-Majada, V., Ermolaeva, M., Kirsch, P., Sterner-Kock, A., van Loo, G., & Pasparakis, M. (2011). FADD prevents RIP3-

- mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature*, 477(7364), 330–334. <https://doi.org/10.1038/nature10273>
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Williams, J. M., Duckworth, C. A., Burkitt, M. D., Watson, A. J. M., Campbell, B. J., & Pritchard, D. M. (2015). Epithelial Cell Shedding and Barrier Function: A Matter of Life and Death at the Small Intestinal Villus Tip. *Veterinary Pathology*, 52(3), 445–455. <https://doi.org/10.1177/0300985814559404>
- Woznicki, J. A., Saini, N., Flood, P., Rajaram, S., Lee, C. M., Stamou, P., Skowrya, A., Bustamante-Garrido, M., Regazzoni, K., Crawford, N., McDade, S. S., Longley, D. B., Aza-Blanc, P., Shanahan, F., Zulquernain, S. A., McCarthy, J., Melgar, S., McRae, B. L., & Nally, K. (2021). TNF- $\alpha$  synergises with IFN- $\gamma$  to induce caspase-8-JAK1/2-STAT1-dependent death of intestinal epithelial cells. *Cell Death & Disease* 2021 12:10, 12(10), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04151-3>
- Xie, Y., Zhao, Y., Shi, L., Li, W., Chen, K., Li, M., Chen, X., Zhang, H., Li, T., Matsuzawa-Ishimoto, Y., Yao, X., Shao, D., Ke, Z., Li, J., Chen, Y., Zhang, X., Cui, J., Cui, S., Leng, Q., ... Xiao, H. (2020). Gut epithelial TSC1/mTOR controls RIPK3-dependent necroptosis in intestinal inflammation and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 2111–2128. <https://doi.org/10.1172/JCI133264>
- Xu, Z., Chen, Z. M., Wu, X., Zhang, L., Cao, Y., & Zhou, P. (2020). Distinct Molecular Mechanisms Underlying Potassium Efflux for NLRP3 Inflammasome Activation. *Frontiers in Immunology*, 11(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609441>
- Yuan, Y. Y., Xie, K. X., Wang, S. L., & Yuan, L. W. (2018). Inflammatory caspase-related pyroptosis : mechanism , regulation and therapeutic potential for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Report*, 6(July), 1–10. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy011>
- Zhang, G., Chen, H., Guo, Y., Zhang, W., Jiang, Q., Zhang, S., Han, L., Chen, S., & Xue, R. (2021). Activation of Platelet NLRP3 Inflammasome in Crohn's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.705325>
- Zhen, Y., & Zhang, H. (2019). NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00276>
- Zhong, Y., Kinio, A., & Saleh, M. (2013). Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 4). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00333>
- Zhu, P., Martinvalet, D., Chowdhury, D., Zhang, D., Schlesinger, A., & Lieberman, J. (2009). The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood*, 114(6), 1205–1216. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195768>
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9), 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>
- Zmora, N., Levy, M., Pevsner-Fishcer, M., & Elinav, E. (2017). Inflammasomes and intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*, 10(4), 865–883. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.19>

Zorro, M. M., Aguirre-Gamboa, R., Mayassi, T., Ciszewski, C., Barisani, D., Hu, S., Weersma, R. K., Withoff, S., Li, Y., Wijmenga, C., Jabri, B., & Jonkers, I. H. (2020). Tissue alarmins and adaptive cytokine induce dynamic and distinct transcriptional responses in tissue-resident intraepithelial cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Autoimmunity*, 108(January). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102422>

