



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***Trabajo de tesis doctoral***

---

*“Inducción de mecanismos de la respuesta innata por péptidos de gliadinas en un modelo de enteropatía experimental. Rol en el desencadenamiento de enfermedad celíaca”*

---

*Lic. María Florencia Gómez Castro*

Director: Fernando G. Chirido  
Codirectora: Paula Carasi

**2019**



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

La Plata, Buenos Aires, Mayo de 2019



Los resultados mostrados en este trabajo de Tesis forman parte de los siguientes manuscritos:

❖ *“Mechanisms of innate immune activation by gluten peptide p31-43 in mice”*

Autores: Araya RE, Gomez Castro MF, Carasi P, McCarville JL, Jury J, Mowat AM, Verdú EF, Chirido FG.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016 Jul 1;311(1):G40-9.

doi: 10.1152/ajpgi.00435.2015.

❖ *“P31-43 Gliadin Peptide Forms Oligomers and Induces NLRP3 Inflammasome/Caspase 1- Dependent Mucosal Damage in Small Intestine”*

Autores: Gómez Castro MF, Miculán E, Herrera MG, Ruera C, Perez F, Prieto ED, Barrera E, Pantano S, Carasi P, Chirido FG.

Front Immunol. 2019 Jan 30;10:31.

doi: 10.3389/fimmu.2019.00031. eCollection 2019

❖ *“Structural characterization of the p31-43 gliadin peptide reveals poly-proline type II structure and self-organization nature in aqueous solutions”*

Autores: María Georgina Herrera #, María Florencia Gómez Castro #, Eduardo Prieto, Exequiel Barrera, Verónica I. Doderó, Sergio Pantano, and Fernando Chirido.

#Estos autores contribuyeron en igual medida a este trabajo.

(Manuscrito en preparación)



# Resumen

El gluten es una mezcla heterogénea de proteínas, principalmente gliadinas y gluteninas, que al ser ingerido es degradado por enzimas del tracto gastrointestinal. Algunos péptidos derivados de gluten son resistentes a la degradación enzimática y pueden encontrarse en el lumen intestinal y desencadenar respuestas inmunes tanto adaptativas, como innatas. Entre los péptidos derivados de gliadina resistentes a la degradación se encuentra el péptido p31-43, que no se une a moléculas de MHC de clase II y en consecuencia no es capaz de inducir una respuesta adaptativa específica. Existen numerosos estudios *in vitro* acerca de la toxicidad de p31-43, sin embargo, en la actualidad se desconoce su receptor celular y no se han descrito en profundidad sus efectos *in vivo*. En el presente trabajo de tesis se utilizó un modelo murino de enteropatía inducida mediante la administración intraluminal de p31-43, así como también se desarrolló un modelo de administración de p31-43 por vía intragástrica, de modo de estudiar mecanismos de la respuesta innata en intestino delgado. En este modelo intentamos reproducir algunos aspectos de la patogenia de enfermedad celíaca (EC). Esta es una enteropatía crónica que se desencadena en individuos genéticamente predispuestos ante el consumo de proteínas de gluten y bajo la influencia de otros factores ambientales. EC tiene una prevalencia global del 1 % y se caracteriza por la presencia de atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas en intestino delgado, así como también, por un marcado incremento en el infiltrado linfocitario en *lamina propria* y en el epitelio intestinal. En este trabajo de tesis se observó que la enteropatía murina inducida, es específica de la secuencia de aminoácidos de p31-43 y dependiente de la vía de IFN tipo I. Además, corroboramos que p31-43 induce apoptosis tanto *in vitro*, como *in vivo*. Por otro lado, se caracterizó las propiedades estructurales y de agregación de p31-

43. Se observó que posee una estructura del tipo poliprolina II y que forma agregados proteicos en solución estables a pHs intestinales (3-8), cuyo tamaño se incrementa con la concentración y evolucionan en el tiempo a estructuras más complejas. Finalmente, observamos que las moléculas de NLRP3 y Caspasa-1 estaban implicadas en el daño. Por lo que consideramos que los agregados de p31-43 podrían ser sensados por el inflammasoma NLRP3 y ejercer efectos inflamatorios vía Caspasa-1.



# Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de la Plata, y su carácter de pública y gratuita, que me permitió formarme en mis estudios de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular, y posteriormente realizar la carrera de Doctorado en Biología.

Agradezco a mi director, Fernando, por la posibilidad y la confianza en incorporarme a su grupo de trabajo para la realización de mi doctorado, y a mi codirectora Paula (puli para los amigos) por todas las charlas, risa y horas compartidas en nuestras noches de cirugías; gracias por tu amistad, los consejos, la ayuda constante y porque me enseñaste, de la mejor manera a trabajar con animales, transmitiéndome el respeto que les tenés.

Gracias a todas las personas que conforman el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) por el tiempo compartido y los buenos momentos que me llevo de recuerdo. En especial al “Grupo Chirido” Carito, Ema, Fede y Florcita por ser indispensables en mi día a día del laboratorio y por estar ahí siempre. Gracias a mis compañeros del instituto Kari, Clara, Rodri, Mai, Gasti, Male, Maira, Agus, Meli, con los que compartí risas, experimentos, miles de mates. Gracias por su amistad, son lo más lindo que me llevo de estos años de doctorado.

Gracias a los chiques, mis amigos, Gabi, Eze, Jess, Jazz, Leo, Dolo, Carci, Fran y Diego, porque son todo lo que está bien, gracias por escucharme y apoyarme en los momentos difíciles y por reírnos a pesar de todo, con ustedes este camino fue más fácil y lindo. Gracias a mi amor, Gusta, por ser mi compañero durante todos estos años juntos,

gracias por estar a mi lado, por apoyarme, escucharme y hacerme reír para que todo siga “más o menos bien”.

En especial agradezco a mi familia. Sin ustedes, esto no hubiera sido posible. Gracias má por tus palabras de aliento y amor. Gracias papá por ayudarme durante mi carrera y por tus consejos. Gracias So, por escucharme siempre y darme fuerzas, e intentar que sea mejor cada día (y porque leíste toda la tesis!). Gracias a mi abuela, porque desde el primer momento que comencé mi carrera siempre creyó en mí, gracias abu por tus comidas, tus abrazos y tus consejos. Gracias a Cachi, Gladi, Marce, Igna por su amor constante. Gracias a toda mi familia en Tucumán, es especial a mi abuela Ana María y mi abuelo Ramón. A todos ustedes va dedicado este trabajo.

# Abreviaturas

<sup>51</sup>CR-EDTA: Cromo etilendiamino-tetraacetato.

AFM: Microscopía de fuerza atómica.

COX-2: Ciclooxygenasa-2.

DC: Dicroísmo circular.

DCFDA: 2',7'-diclorofluoresceinadiacetato.

DH: Dermatitis herpetiforme.

DLG: Dieta libre de gluten.

DLS: Dispersión dinámica de la luz.

dsRNA: Acido ribonucléico de doble cadena.

EBD: Colorante azul de Evans.

EC: Enfermedad celíaca.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento.

FCCP: Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazo ne.

GF: Animal libre de gérmenes.

G<sub>te</sub>: Conductancia transepitelial.

GWAS: Análisis de asociación variada del genoma.

H&E: Hematoxilina y eosina.

HLA: Antígeno leucocitario humano.

HMW: Alto peso molecular

IELs: Linfocitos intraepiteliales.

IFN: Interferón.

IFN $\alpha$ R: Receptor de interferones  $\alpha$

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleuquina.

IP: Ioduro de propidio.

Isc: Corriente de corto-circuito.

KO: Animales que no expresan un gen determinado (Knock-out).

LMW: bajo peso molecular.

LPS: Lipopolisacárido

MAMPs: Patrones moleculares asociados a microorganismos.

MCS: Tamaño medio del agregado.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MOMP: Permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

MPTP: Poros de transición mitocondrial.

NK: Células *Natural Killer*.  
NKRs: Receptores de células *Natural Killer*.  
NLM: Nódulo linfático mesentérico.  
OVA: Ovalbumina  
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.  
Pazar: Péptido al azar.  
PBS: Solución de buffer fosfato.  
Pinv: Péptido invertido.  
PNR: Péptido no relacionado  
PPII: Poliprolina II  
PT-Gliadina: Gliadina digerida por pepsina y tripsina.  
qPCR: Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa.  
RE: Retículo endoplasmático.  
REDOX: Reacción de oxidación/reducción.  
RNA<sub>m</sub>: Acido ribonucleico mensajero.  
ROS: Especies reactivas de oxígeno.  
ROS<sub>m</sub>: Especies reactivas de oxígeno mitocondrial.  
R<sub>te</sub>: Resistencia eléctrica transepitelial.

SPE: Animales libres de patógenos específicos.  
TAAC: Trigo, Avena, Cebada y Centeno.  
TCR: Receptores de células T.  
TdT: Enzima desoxitransferasa terminal.  
TEM: Microscopia de transmisión electrónica.  
TFE: 2,2,2-Trifluoroethanol.  
TG2: Enzima Transglutaminasa 2.  
Th1: Linfocito T helper 1.  
T<sub>reg</sub>: Célula T regulatorias.  
TUNEL: *Terminal desoxynucleotidil transferase Tdt mediated dUTP nick end*.  
UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas.  
V/C: Relación velloso/cripta.

# Índice

<b>LOS RESULTADOS MOSTRADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS FORMAN PARTE DE LOS SIGUIENTES MANUSCRITOS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Enfermedad Celíaca: definición, clínica, diagnóstico y prevalencia .....	1
2. Patogenia de la Enfermedad Celíaca .....	5
3. Factores de riesgo en Enfermedad Celíaca .....	10
3.1. Predisposición genética .....	10
3.2. Infecciones virales .....	12
3.3. Disbiosis.....	14
4. Modelos animales para el estudio de Enfermedad Celíaca .....	15
5. Mecanismos de muerte celular asociados a Enfermedad Celíaca .....	17
6. Gluten y prolaminas .....	18
7. Péptido p31-43 .....	20
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
Hipótesis general .....	23
Objetivo general .....	23

<b>CAPÍTULO I: MODELO MURINO DE ENTEROPATÍA INDUCIDA POR EL PÉPTIDO P31-43</b>	<b>27</b>
1. Introducción.....	27
2. Hipótesis.....	31
3. Objetivos específicos.....	31
4. Resultados.....	32
<i>4.1. Sección I: Evaluación de los efectos inducidos por administración intraluminal de p31-43 en un modelo murino</i> .....	<i>32</i>
4.1.1. Estudios realizados en un modelo murino con administración intraluminal de p31-43 por microcirugía.....	33
4.1.1.1. Optimización del protocolo experimental.....	33
4.1.1.2. Inducción de enteropatía en un modelo murino mediante inoculación intraluminal de p31-43.....	36
4.1.1.2.1. Validación del modelo murino.....	36
4.1.1.2.1.1. Inducción en ratones C57BL/6.....	36
4.1.1.2.1.2. Inducción de enteropatía en ratones BALB/c.....	38
4.1.1.2.2. Especificidad de secuencia del daño inducido por p31-43.....	39
4.1.1.2.3. Implicancia de los receptores de interferones tipo I en la generación de enteropatía inducida por p31-43.....	43
4.1.2. Estudios realizados en un modelo murino de enteropatía con administración intragástrica de p31-43.....	44
<i>4.2. Sección II: Evaluación de efectos inducidos por la administración intragástrica de p31-43 en ratones NOD-DQ8</i> .....	<i>51</i>
4.2.1. Efectos inducidos por la administración de p31-43 en ratones NOD-DQ8.....	52
4.2.2. Expresión de mediadores proinflamatorios inducidos por p31-43 en ratones NOD-DQ8.....	54
4.2.3. Efectos de la administración de p31-43 y posteriores desafíos con gluten en ratones NOD-DQ8.....	56

4.2.4. Análisis de permeabilidad en intestino delgado de animales NOD-DQ8 luego de tratamiento con p31-43 y posteriores desafíos con gluten.....	57
4.2.5. Análisis de proliferación de células de bazo específicas de gliadinas luego de tratamiento con p31-43 y posteriores desafíos con gluten.....	59
5. Discusión.....	63
6. Conclusiones .....	71
<b>CAPÍTULO II: ANÁLISIS DE MECANISMOS DE ESTRÉS Y MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR EL PÉPTIDO P31-43.....</b>	<b>75</b>
1. Introducción.....	75
2. Hipótesis .....	79
3. Objetivos específicos .....	79
4. Resultados.....	81
<i>4.1. Sección I: Evaluación de la inducción de estrés y muerte celular en un modelo murino de enteropatía .....</i>	<i>81</i>
4.1.1. Inducción de estrés en un modelo murino de enteropatía.....	81
4.1.1.1. Producción de ROS en células epiteliales intestinales aisladas de ratones tratados con p31-43.....	82
4.1.1.2. Estudio de BIP en intestino delgado de ratones tratados con p31-43 .....	84
4.1.2. Análisis de muerte celular inducida por p31-43 en un modelo murino de enteropatía .....	86
4.1.2.1. Inducción de muerte celular en células epiteliales extraídas de ratones tratados con p31-43.....	87
4.1.2.2. Evaluación de muerte celular en el tejido intestinal murino inducida por p31-43.....	88
<i>4.2. Sección II Evaluación de mecanismos de muerte celular y estrés inducido por administración de p31-43 in vitro .....</i>	<i>91</i>
4.2.1. Análisis de la producción de ROS in vitro .....	91
4.2.1.1. Análisis de inducción de apoptosis <i>in vitro</i> en líneas celulares THP-1 y HT29 .....	93

4.2.2. Despolarización del potencial de membrana mitocondrial en células THP-1 .....	93
5. Discusión.....	97
6. Conclusiones .....	101
<b>CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE p31-43 Y SU IMPLICANCIA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA .....</b>	<b>105</b>
1. Introducción.....	105
2. Hipótesis .....	111
3. Objetivos específicos .....	111
4. Resultados.....	113
<i>4.1. Sección I: Caracterización estructural de p31-43 .....</i>	<i>113</i>
4.1.1. Análisis de la estructura secundaria de p31-43 mediante difracción de rayos X ..	113
4.1.1.1. Evaluación de equilibrio conformacional de p31-43 por difracción de rayos X .....	114
4.1.2. Caracterización de oligómeros de p31-43 en solución mediante sonda fluorescente BODIPY y dispersión dinámica de la luz (DLS) .....	116
4.1.3. Análisis de nanoestructuras de p31-43 mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) .....	118
4.1.4. Análisis de formación de oligómeros de p31-43 por microscopía de fuerza atómica (AFM).....	120
4.1.5. Análisis de cinética de agregación de oligómeros de p31-43 mediante AFM ....	124
4.1.6. Modelado in silico de p31-43.....	128
4.1.7. Efectos de variaciones de pH en agregados de p31-43.....	131
<i>4.2. Sección II: Vías de señalización involucradas en el daño intestinal inducido por p31-43 in vivo.....</i>	<i>132</i>
4.2.1. Análisis de la implicancia del inflamasoma NLRP3 en la enteropatía inducida por oligómeros de p31-43 .....	132
5. Discusión.....	135
6. Conclusiones .....	141



<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>145</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>151</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>155</b>
1. Animales utilizados .....	155
2. Análisis histológico.....	157
3. Intervenciones y manipulaciones con animales .....	159
3.1. <i>Inoculación intraluminal</i> .....	159
3.1.1. Inoculación con colorante azul de Evans.....	159
3.2. <i>Inoculación intragástrica</i> .....	160
4. Medidas de expresión utilizando PCR cuantitativa .....	161
5. Análisis de permeabilidad de tejido de intestino delgado.....	163
6. Cultivo celular de líneas THP-1 y HT29.....	164
7. Obtención de suspensiones celulares.....	165
7.1. <i>Aislamiento de células de bazo de ratón</i> .....	165
7.2. <i>Aislamiento de fracción de células epiteliales de ratón</i> .....	166
8. Citometría de flujo .....	166
8.1. <i>Análisis de proliferación de células de bazo específicas de gliadina</i> .....	166
8.2. <i>Análisis de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i> .....	169
8.3. <i>Medida de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial</i> .....	169
8.4. <i>Análisis de apoptosis mediante Anexina V/Ioduro de propidio</i> .....	170
9. Análisis de apoptosis en tejido intestinal mediante TUNEL.....	171

10. Inmunofluorescencia en tejido intestinal murino.....	172
11. Dicroísmo circular.....	173
12. Microscopía aplicada en estudios biofísicoquímicos .....	174
12.1. Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	174
12.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	174
13. Modelado de la conformación de p31-43 in silico .....	175
14. Dispersión dinámica de la luz (DLS) .....	176
15. Determinación de agregados en solución utilizando la sonda BODIPY .....	176
<b>ANEXO.....</b>	<b>181</b>
1. Nomenclatura de aminoácidos.....	181
2. Composición de soluciones utilizadas.....	182
2.1. Buffer Krebs base (1000mL).....	182
2.1.1. Solución KRB (1000mL).....	182
2.1.2. KRB 1X + Glucosa 10mM: .....	182
2.1.3. KRB 1X + Manitol 10mM:.....	182
2.2. Medio RPMI completo (1000mL) .....	182
2.3. Medio RPMI enriquecido (1000mL).....	183
2.4. Medio DMEM completo (1000mL).....	183
2.5. Buffer Binding (10X) .....	183
2.6. Buffer FACS (1000mL).....	183
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>187</b>

# Índice de figuras

<i>FIGURA 1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE MARSH-OBERHUBER.....</i>	<i>4</i>
<i>FIGURA 2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.....</i>	<i>7</i>
<i>FIGURA 3. GENES Y MOLÉCULAS DE HLA IMPLICADAS EN ENFERMEDAD CELÍACA.....</i>	<i>11</i>
<i>FIGURA 4. INOCULACIÓN INTRALUMINAL DE COLORANTE AZUL DE EVANS EN RATONES C57BL/6.....</i>	<i>35</i>
<i>FIGURA 5. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRALUMINAL DE P31-43 DE RATONES C57BL/6.....</i>	<i>36</i>
<i>FIGURA 6. EL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 INDUCE DAÑO EN LA MUCOSA INTESTINAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO EN C57BL/6.....</i>	<i>37</i>
<i>FIGURA 7. EL PÉPTIDO P31-43 INDUCE DAÑO EN LA MUCOSA INTESTINAL EN RATONES BALB/c.....</i>	<i>39</i>
<i>FIGURA 8. EL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 INDUCE DAÑO SECUENCIA-ESPECÍFICO EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATONES C57BL/6.....</i>	<i>40</i>
<i>FIGURA 9. EL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 INDUCE LA EXPRESIÓN SECUENCIA-ESPECÍFICA DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATONES C57BL/6.....</i>	<i>42</i>
<i>FIGURA 10. LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS INDUCIDOS POR P31-43 SON DEPENDIENTES DE IFN TIPO I.....</i>	<i>43</i>
<i>FIGURA 11. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRAGÁSTRICA CON DIFERENTES DOSIS DE P31-43 EN RATONES C57BL/6.....</i>	<i>45</i>
<i>FIGURA 12. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE INTESTINO DELGADO A LAS DOSIS DE P31-43 ADMINISTRADAS INTRAGÁSTRICAMENTE.....</i>	<i>46</i>
<i>FIGURA 13. EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAGÁSTRICA DE P31-43.....</i>	<i>47</i>
<i>FIGURA 14. DISEÑO EXPERIMENTAL DE CINÉTICA CON P31-43.....</i>	<i>48</i>
<i>FIGURA 15. EVALUACIÓN CINÉTICA DE DAÑO CON P31-43.....</i>	<i>49</i>
<i>FIGURA 16. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRAGÁSTRICA DE P31-43 DE RATONES NOD-DQ8.....</i>	<i>53</i>
<i>FIGURA 17. EN RATONES NOD-DQ8, P31-43 INDUCE AUMENTO EN EL NÚMERO DE IELS SIN DISMINUCIÓN SIGNIFICATIVA EN LA RELACIÓN V/C.....</i>	<i>54</i>
<i>FIGURA 18. NIVELES DE RNA MENSAJERO EN MUESTRAS DE INTESTINO DELGADO PROXIMAL DE RATONES NOD-DQ8 TRATADOS CON P31-43.....</i>	<i>55</i>
<i>FIGURA 19. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRAGÁSTRICA DE P31-43 DE RATONES NOD-DQ8.....</i>	<i>56</i>

<i>FIGURA 20. ANÁLISIS DE LA HISTOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO DE ANIMALES NOD-DQ8 LUEGO DE 4 SEMANAS DE TRATAMIENTO.....</i>	<i>57</i>
<i>FIGURA 21. EL PRETRATAMIENTO CON P31-43 NO INDUCE CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD INTESTINAL</i>	<i>59</i>
<i>FIGURA 22. EL PRE-TRATAMIENTO CON P31-43 INDUCE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS DE BAZO DE MANERA NO ESPECIFICA PARA PT-GLIADINA.....</i>	<i>61</i>
<i>FIGURA 23. ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE POBLACIONES POR CITOMETRÍA DE FLUJOS PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....</i>	<i>82</i>
<i>FIGURA 24. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN LA FRACCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES 4H Y 16 H POST TRATAMIENTO CON P31-43.....</i>	<i>83</i>
<i>FIGURA 25. EXPRESIÓN DE BIP EN INTESTINO DELGADO.....</i>	<i>85</i>
<i>FIGURA 26. P31-43 INDUCE UN AUMENTO DE CÉLULAS BIP EN INTESTINO DELGADO.....</i>	<i>86</i>
<i>FIGURA 27. P31-43 INDUCE IN VIVO APOPTOSIS EN CÉLULAS DEL EPITELIO INTESTINAL.....</i>	<i>88</i>
<i>FIGURA 28. DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR POR TUNEL EN INTESTINO DE ANIMALES TRATADOS POR VÍA INTRAGÁSTRICA CON P31-43.....</i>	<i>89</i>
<i>FIGURA 29. P31-43 ADMINISTRADO POR VÍA ORAL INDUCE MUERTE CELULAR EN INTESTINO DELGADO PROXIMAL.....</i>	<i>90</i>
<i>FIGURA 30. LOS NIVELES DE ROS EN CÉLULAS THP-1 NO VARÍAN LUEGO DE 6 HORAS DE TRATAMIENTO CON P31-43.....</i>	<i>91</i>
<i>FIGURA 31. ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE POBLACIONES POR CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....</i>	<i>92</i>
<i>FIGURA 32. EL PÉPTIDO P31-43 INDUCE MUERTE CELULAR EN CÉLULAS THP-1 PERO NO EN CÉLULAS HT29.....</i>	<i>93</i>
<i>FIGURA 33. P31-43 INDUCE CAMBIOS EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....</i>	<i>95</i>
<i>FIGURA 34. ESPECTRO EN EL UV LEJANO ASOCIADO CON VARIOS TIPOS DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE CADENAS PÉPTIDICAS.....</i>	<i>107</i>
<i>FIGURA 35. EL PÉPTIDO P31-43 POSEE UNA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL TIPO POLIPROLINA II.....</i>	<i>114</i>
<i>FIGURA 36. DICROÍSMO CIRCULAR DEL PÉPTIDO DE P31-43 OBTENIDO EN PRESENCIA DE UREA Y TFE.....</i>	<i>116</i>
<i>FIGURA 37. CARACTERIZACIÓN DE OLIGÓMEROS DE P31-43 EN SOLUCIÓN MEDIANTE SONDA FLUORESCENTE BODIPY Y DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS).....</i>	<i>117</i>
<i>FIGURA 38. CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS OLIGOMÉRICAS DE P31-43 POR TEM.....</i>	<i>119</i>
<i>FIGURA 39. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 A 5 μM POR AFM.....</i>	<i>122</i>

<i>FIGURA 40. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA POR AFM DE P31-43 A 50 <math>\mu</math>M.....</i>	<i>123</i>
<i>FIGURA 41. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 A 100 <math>\mu</math>M POR AFM .....</i>	<i>124</i>
<i>FIGURA 42. CINÉTICA DE AGREGACIÓN DE P31-43 A 10 <math>\mu</math>M.....</i>	<i>126</i>
<i>FIGURA 43. CINÉTICA DE AGREGACIÓN DE P31-43 A 50 <math>\mu</math>M.....</i>	<i>127</i>
<i>FIGURA 44. MODELADO MOLECULAR Y SIMULACIÓN DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE P31-43 .....</i>	<i>129</i>
<i>FIGURA 45. SIMULACIÓN DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE P31-43.....</i>	<i>130</i>
<i>FIGURA 46. DICROÍSMO CIRCULAR DE SOLUCIONES DE P31-43 A DISTINTOS PHs.....</i>	<i>131</i>
<i>FIGURA 47. LA ENTEROPATÍA INDUCIDA POR P31-43 REQUIERE DE NLRP3 Y DE CASPASA-1 .....</i>	<i>133</i>
<i>FIGURA 48. MECANISMOS DE DAÑO INDUCIDOS POR P31-43 EN EPITELIO INTESTINAL.....</i>	<i>147</i>
<i>FIGURA 49. IMÁGENES REPRESENTATIVAS PARA ESQUEMATIZAR EL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....</i>	<i>158</i>

## **Índice de tablas**

<i>TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS DE TRIGO.....</i>	<i>19</i>
<i>TABLA 2. RATONES UTILIZADOS.....</i>	<i>155</i>
<i>TABLA 3. SECUENCIAS DE PÉPTIDOS UTILIZADOS.....</i>	<i>159</i>
<i>TABLA 4. SECUENCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS.....</i>	<i>162</i>
<i>TABLA 5. PANEL DE ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO ESPECÍFICO DE GLIADINAS .....</i>	<i>169</i>



# INTRODUCCIÓN





# Introducción

## ***1. Enfermedad Celíaca: definición, clínica, diagnóstico y prevalencia***

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica que se desencadena en individuos genéticamente predispuestos, ante el consumo de proteínas provenientes del trigo, avena, cebada y centeno (Abadie et al. 2011; Meresse, Malamut, y Cerf-Bensussan 2012). La EC está caracterizada por una respuesta inmune exacerbada de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de péptidos derivados de gluten. Estas células T reconocerán péptidos deamidados en un contexto de moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) tipo II, particularmente, HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 (Meresse, Malamut, y Cerf-Bensussan 2012) y se producirá una respuesta proinflamatoria del tipo T helper 1 (Th1).

En condiciones normales, el intestino delgado posee una respuesta inmune tolerogénica hacia los péptidos de gluten que llegan al lumen intestinal. Esta homeostasis está mantenida por linfocitos T regulatorios, que inhibirán la inducción de una respuesta adaptativa T específica ante antígenos de gluten, promoviendo la expresión de IgA. Por otro lado, en un intestino que ha perdido la tolerancia a estos péptidos de gluten, las células T se diferenciarán en Th1 específicas de gluten, que se activarán y expandirán, secretando mediadores proinflamatorios. Entre ellos, es importante mencionar al IFN- $\gamma$  ya que puede actuar sobre células del epitelio intestinal y promover la activación de linfocitos citotóxicos intraepiteliales, los cuales están implicados en la muerte de células epiteliales intestinales y en la remodelación tisular. También se verá afectada la función tolerogénica de los linfocitos T regulatorios FOXP3<sup>+</sup>.

En EC se produce daño en la mucosa del intestino delgado, caracterizada por atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas, así como también, por un marcado incremento en el infiltrado linfocitario en *lamina propria* y en el epitelio intestinal. EC puede ocurrir en cualquier momento de la vida, y es más frecuente en mujeres que en hombres (relación 2:1). Las manifestaciones clínicas son muy variadas y difieren entre pacientes pediátricos o adultos (Abadie et al. 2011). La presentación clínica característica incluye síntomas intestinales como diarrea crónica, distensión abdominal y pérdida de peso, todos estos asociados al fenómeno de mala absorción ocasionado por el severo cambio histológico de la mucosa intestinal. En adultos, se pueden observar más frecuentemente manifestaciones extraintestinales secundarias a la mala absorción, como anemia u osteoporosis, además en algunos casos se observa la presencia de una patología cutánea denominada Dermatitis Herpetiforme, caracterizada por la presencia de depósitos de IgA en la piel y vesículas pruriginosas. También se observan desórdenes neurológicos e infertilidad (Lebwohl, Ludvigsson, y Green 2015).

Los pacientes con sospecha clínica, por sintomatología, familiaridad o presencia de enfermedad asociada deben ingresar en un protocolo de diagnóstico de EC. Las herramientas actuales de diagnóstico consisten en primer lugar en evaluar la presencia de un panel de anticuerpos específicos en suero, anti-transglutaminasa 2 (TG2), anti-endomisio y anti-péptidos deamidados de gliadinas. Si estos presentan valores positivos, al paciente se le indicará una endoscopia alta con toma de piezas de biopsia intestinal de segunda porción y bulbo. En la endoscopia suelen observarse alteraciones en la mucosa intestinal sugestivas de la presencia de EC. La información de confirmación diagnóstica se obtiene a partir de la evaluación histológica de las biopsias. Dado que es posible encontrar variaciones en el daño de la mucosa. En las piezas de biopsias teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E), se evalúan las características de las vellosidades y criptas,

## *Introducción*

y se informa un parámetro denominado relación Vellosidad/Cripta (V/C) que consiste en la relación entre el largo de la vellosidad y la profundidad de la cripta. También se realiza un recuento del número de linfocitos intraepiteliales (IELs) por cada 100 enterocitos presentes en puntas de vellosidades escogidas al azar. Finalmente, se asigna un puntaje de acuerdo con la clasificación de Marsh - Oberhuber (Marsh y Crowe 1995; Marsh 1992). En esta clasificación, se definen cuatro categorías de lesiones asociadas a EC: Pre-infiltrativa (Tipo 0); infiltrativa (Tipo 1); infiltrativa-hiperplásica (Tipo 2); plana y destructiva (Tipo 3) y finalmente la lesión atrófica-hipoplásica (Tipo 4). Posteriormente Oberhuber (Oberhuber 2000) modificó dicho score y subcategorizó las lesiones de tipo 3, como atrofia leve (Tipo 3a), atrofia marcada (Tipo 3b) y atrofia total de las vellosidades (tipo 3c).

Es importante destacar que la evaluación histológica de las biopsias, define el diagnóstico de EC y que solo luego de un diagnóstico confirmatorio de EC, el paciente debe comenzar la dieta de exclusión de proteínas de trigo, es decir, una dieta libre de Gluten (DLG). Este es el único tratamiento efectivo para esta patología en la actualidad. Como mencionamos, la presentación clínica de EC es altamente variable y es remarcable la gran proporción de pacientes asintomáticos o pacientes que solo poseen signos menores subclínicos como cansancio o irritabilidad (Husby y Murray 2014).

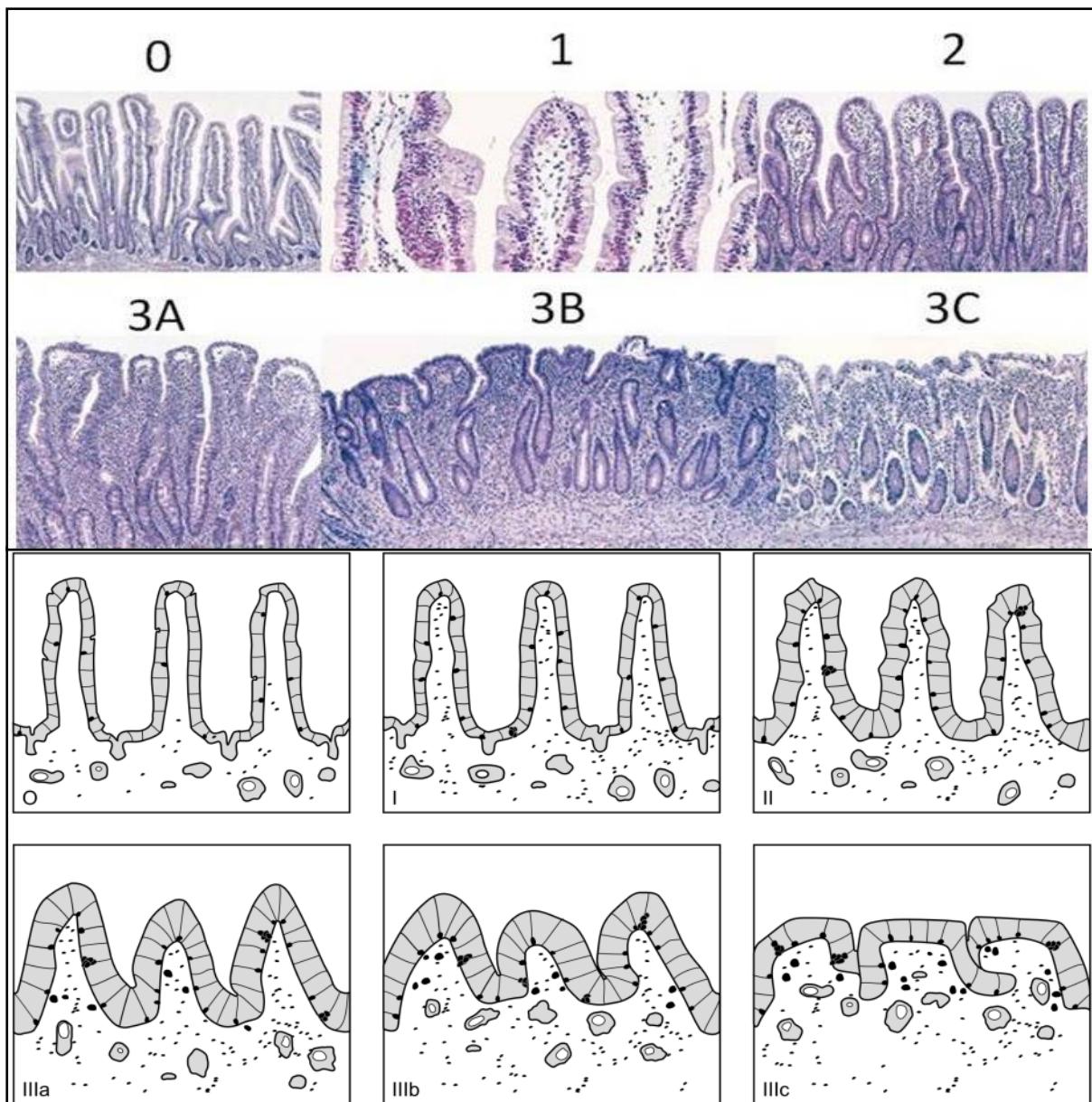


FIGURA 1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE MARSH-OBERHUBER

**Panel superior:** Histología de intestino delgado de todos los estadios de la clasificación de Marsh-Oberhuber. **Panel inferior:** esquemas simplificados que muestran la altura de las vellosidades y el infiltrado linfocitario en todos los estadios de la clasificación de Marsh-Oberhuber. En esta clasificación, se definen cuatro categorías de lesiones asociadas a EC: Pre- infiltrativa (Tipo 0); infiltrativa (Tipo 1); infiltrativa-hiperplásica (Tipo 2); plana y destructiva (Tipo 3 a, b y c). Figura extraída de Anna Myléus, 2012 y Jos W. R. Meijer, 2002.

Dado que EC, es la patología más fuertemente asociada al sistema de HLA, en particular a los alelos HLA-DQ2 y DQ8, se ha propuesto la determinación de estos alelos como estudios complementarios en el diagnóstico de EC. Esta es una prueba de alto valor

predictivo negativo, con lo cual, en casos con HLA no compatible es considerado muy poco probable la presencia de EC. Esta determinación es de utilidad en caso donde no se puede llegar a un diagnóstico definitivo en el protocolo convencional o como un dato complementario en la evaluación de casos con patologías asociadas.

La enfermedad celíaca es una de las patologías de base inmune más frecuentes. Su prevalencia varía dependiendo del sexo, edad y etnia. Se describió que la prevalencia basada en biopsias confirmadas positivas es del 0,7 %. Sin embargo, la seroprevalencia a EC, basada en la detección de anticuerpos anti-TG2 y antiendomiso, es marcadamente superior y del orden de 1,4 % (Singh et al. 2018). Además, estudios recientes sugieren un aumento en la prevalencia de EC a lo largo del tiempo, desde un 0,6% a un 0,8%, considerando los periodos de 1991-2000 y 2011-2016 respectivamente (Singh et al. 2018). Esto en parte puede deberse a una mayor concientización general sobre la enfermedad, así como también a mejores herramientas de diagnóstico que disminuyeron de manera global el sub diagnóstico.

## ***2. Patogenia de la Enfermedad Celíaca***

Como mencionamos en EC se produce un daño a la mucosa del intestino delgado proximal, debido a una exacerbada respuesta por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de *lamina propria*. Estos linfocitos T reconocen péptidos de gliadinas deamidados por acción de la enzima transglutaminasa 2 (TG2) en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 presentados por células dendríticas. Luego de captar los péptidos deamidados derivados de gluten, las células dendríticas migran desde la *lamina propria* a los nódulos linfáticos mesentéricos donde activan y diferencian a linfocitos T hacia un perfil Th1. Estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> son productores de IFN $\gamma$ , citoquina central al mecanismo de daño en la mucosa intestinal, ya que activa a las células

dendríticas hacia un perfil proinflamatorio en vez de tolerogénico, desestabiliza las uniones estrechas entre enterocitos, activa a los linfocitos intraepiteliales (IELs) potenciando su función citotóxica y expande poblaciones de células B que producen anticuerpos anti-péptidos derivados de gluten y autoanticuerpos anti-TG2 (Meresse, Malamut, y Cerf-Bensussan 2012).

Es de destacar que el conocimiento que tenemos sobre la patogenia de EC fue obtenido a partir del trabajo experimental empleando pequeñas piezas de biopsia duodenal. En este sentido, se conoce hoy que además de la respuesta adaptativa a péptidos derivados de gluten, la inducción de respuesta innata es relevante en la patogenia de EC. Diversos elementos asociados al epitelio y a las células dendríticas han sido considerados como factores claves en el desarrollo de eventos proinflamatorios, en los que citoquinas como IFN $\alpha$  e IL-15 parecen tener un rol predominante (S. M. Kim, Mayassi, y Jabri 2015; Schumann et al. 2017).

En esta sección, describiremos de manera secuencial los mecanismos involucrados en la patogenia de EC (Figura 2) comenzando por el factor ambiental crítico para su desarrollo, el gluten. El mismo comprende una mezcla heterogénea de proteínas, que incluye péptidos ricos en prolina y glutamina, que son resistentes a la degradación por enzimas del tracto gastrointestinal y permanecen en el lumen intestinal como péptidos largos. Estos péptidos presentan secuencias largas y repetitivas que contienen sitios inmunogénicos, algunos tienen secuencias de deamidación selectiva por TG2. Estos péptidos deamidados se unen con alta afinidad a los alelos de susceptibilidad (HLA DQ2/8) e inducen una alta respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos.

Los péptidos derivados de gluten son transportados a través de la célula epitelial de manera muy selectiva por medio de CD71 (receptor de transferrina) que permite un pasaje muy eficiente y sin degradación desde el lumen hacia la *lamina propria* (figura2-1). CD71 se encuentra sobreexpresado en pacientes celíacos y una complejos inmunes de IgA anti-gliadinas/ gliadinas (Matysiak-Budnik et al. 2008). Estos complejos ingresan en una vía de retro-transporte que evade la degradación lisosomal permitiendo la transcitosis de los complejos inmunes desde la membrana apical hacia la basal (figura2-1). De esta manera, péptidos de gran tamaño son liberados a la *lamina propria* donde

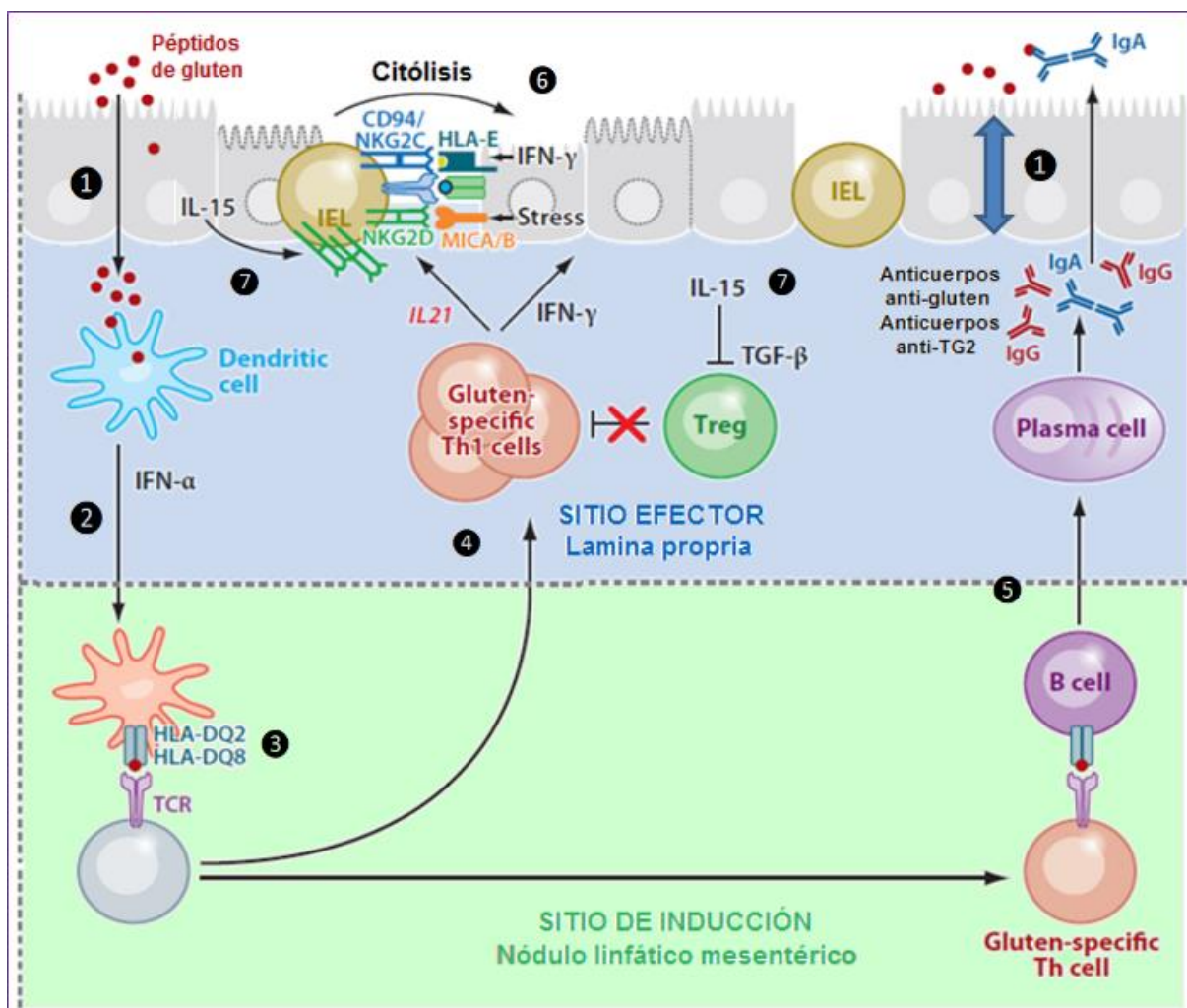


FIGURA 2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

Esquema simplificado de los mecanismos y principales células implicados en la patogenia de Enfermedad Celíaca. (Imagen adaptada de Abadie, 2011).

pueden ser capturados por células dendríticas (Lebreton et al. 2012). Este es un mecanismo muy selectivo y eficiente pero es muy probable que los péptidos derivados de gluten, utilicen otras vías adicionales para ingresar, como el pasaje paracelular en que la mucosa intestinal de pacientes celíacos presenta alteración en las uniones estrechas (Schumann et al. 2017)

Los péptidos que contengan los motivos Q-(X)-P (siendo Q: glutamina y P: prolina) aminoácidos muy frecuentes en la secuencia de gliadinas y gluteninas, serán excelentes sustratos para deamidación por parte de la enzima TG2 (figura 2-**2**). Esta enzima se encuentra constitutivamente expresada en distintos tejidos tanto en el espacio extracelular, asociada a la membrana plasmática o dentro de la célula y es capaz de convertir residuos de Glutamina(Q) en Glutamato(E), cargados negativamente. Como mencionamos, estos péptidos deamidados en posiciones selectivas presentan mayor afinidad de unión a los alelos HLA de susceptibilidad.

Las células dendríticas de pacientes celíacos poseen un fenotipo más proinflamatorio que tolerogénico a diferencia de las condiciones homeostáticas en intestino delgado normal. En *lamina propria* estas células endocitan, procesan y presentan los péptidos deamidados de gluten en un contexto de moléculas HLA-DQ2.5 y DQ8 y luego migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) donde activan y diferencian células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (figura 2-**3**). Estos linfocitos TH1 recirculan y se localizan nuevamente en *lamina propria* y posterior a una nueva activación local, se expanden clonalmente y secretan citoquinas proinflamatorias como IFN  $\gamma$  e IL-21 (Meresse, Malamut, y Cerf-Bensussan 2012)(figura 2-**4**). Estos linfocitos Th1 colaboran en la activación de células B que producirán anticuerpos anti-TG2 y anti-péptidos deamidados de gluten (figura 2-**5**).



Por otro lado, el aumento de IELs refleja la importancia del sistema inmune innato en EC (Lebwohl, Ludvigsson, y Green 2015). En gran parte, el daño epitelial es mediado por IELs con función citotóxica potenciada por la presencia de altos niveles locales de  $IFN\gamma$  e IL-21. Estos IELs expresan receptores activadores del sistema Natural Killer (NKR), NKG2D y NKG2C/CD94, que reconocen señales de estrés en los enterocitos como moléculas de MHC clase I no clásicas (MICA y HLA-E). Estos ligandos de los receptores activadores participan en las vías de muerte de los enterocitos (figura 2-6).

Otra citoquina relevante en la respuesta innata en EC es IL-15 (figura 2-7), cuya expresión se observó incrementada en pacientes celíacos (Escudero-Hernández, Peña, y Bernardo 2016). En el epitelio, IL-15 induce la expresión de NKG2D en la membrana de los IELs, que se unirá al MICA expresado en la membrana de los enterocitos (inducido por estrés), esto permite a los IELs actuar como células citotóxicas e inducir apoptosis de enterocitos (Abadie et al. 2011). Si bien se considera que este sería el mecanismo principal por el cual ocurre la muerte de enterocitos y responsable de la mayor pérdida de células epiteliales (Sollid y Jabri 2013), trabajos previos de nuestro grupo mostraron que la expresión de los ligandos como MICA pueden estar ligados a otros procesos en la mucosa intestinal no limitados a la señalización de la muerte del enterocito (Allegretti et al. 2013).

En el caso de IL-15 se ha descrito, que interviene en el bloqueo de la función de las células T reguladoras FoxP3<sup>+</sup> (Treg) presentes en *lamina propria*, por interferencia de la señalización de TGF  $\beta$ , citoquina crítica en la función supresora en la mucosa intestinal (Benahmed et al. 2007; Ahmed et al. 2009).

En este trabajo de tesis se analizará cómo péptidos derivados de gluten, en particular el p31-43, que no es presentado por HLA tiene diferentes efectos biológicos e inducen mecanismos de la respuesta innata.

### ***3. Factores de riesgo en Enfermedad Celíaca***

#### **3.1. Predisposición genética**

En el locus de moléculas de HLA clase II, se encuentran los genes que codifican para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de DP, DQ, DR (Figura 3A). Estas cadenas se unen entre sí formando heterodímeros con un sitio de unión a antígenos, formado por los correspondientes dominios amino terminales ( $\alpha_1$  y  $\beta_1$ ). Estas moléculas se expresan con alta densidad en la superficie celular de las células dendríticas (Figura 3B). Un aspecto muy relevante del sistema HLA, es su elevado polimorfismo.

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. Casi la totalidad de los pacientes celíacos expresan uno u otro de ellos. En población de origen europeo y en nuestra región, HLA-DQ2 se encuentra más frecuentemente que HLA-DQ8.

La mayoría de los pacientes poseen una variable determinada de los heterodímeros DQ2, que se denomina HLA-DQ2.5, en la cual la cadena  $\alpha$  esta codificada por el alelo HLA-DQ A1\*05 y la cadena  $\beta$  codificada por el alelo HLA-DQB1\*02.

Por otro lado, el resto de los pacientes expresan heterodímeros HLA-DQ8, que están codificados por los alelos DQA1\*03 y por DQB1\*03:02. Una menor proporción de pacientes expresa una variante de DQ2, denominada DQ2.2, codificada por los alelos DQA1\*-02:01 y DQB1\*-02:02, que confiere el menor riesgo a EC (Abadie et al. 2011).

Existen muy pocos casos de pacientes celíacos que no expresan ninguno de estos tres haplotipos, y en ellos en general se encuentra HLA-DQ 7.5 (Karell et al. 2003). La distribución de los alelos DQ2.5, DQ8 y DQ2.2 entre los pacientes celíacos varía según las diferentes ubicaciones geográficas y etnias.

Las bases moleculares de la interacción entre los péptidos derivados de gluten y las moléculas de HLA-DQ2.5, DQ8 o DQ2.2 están bien establecidas (Meresse, Malamut, y

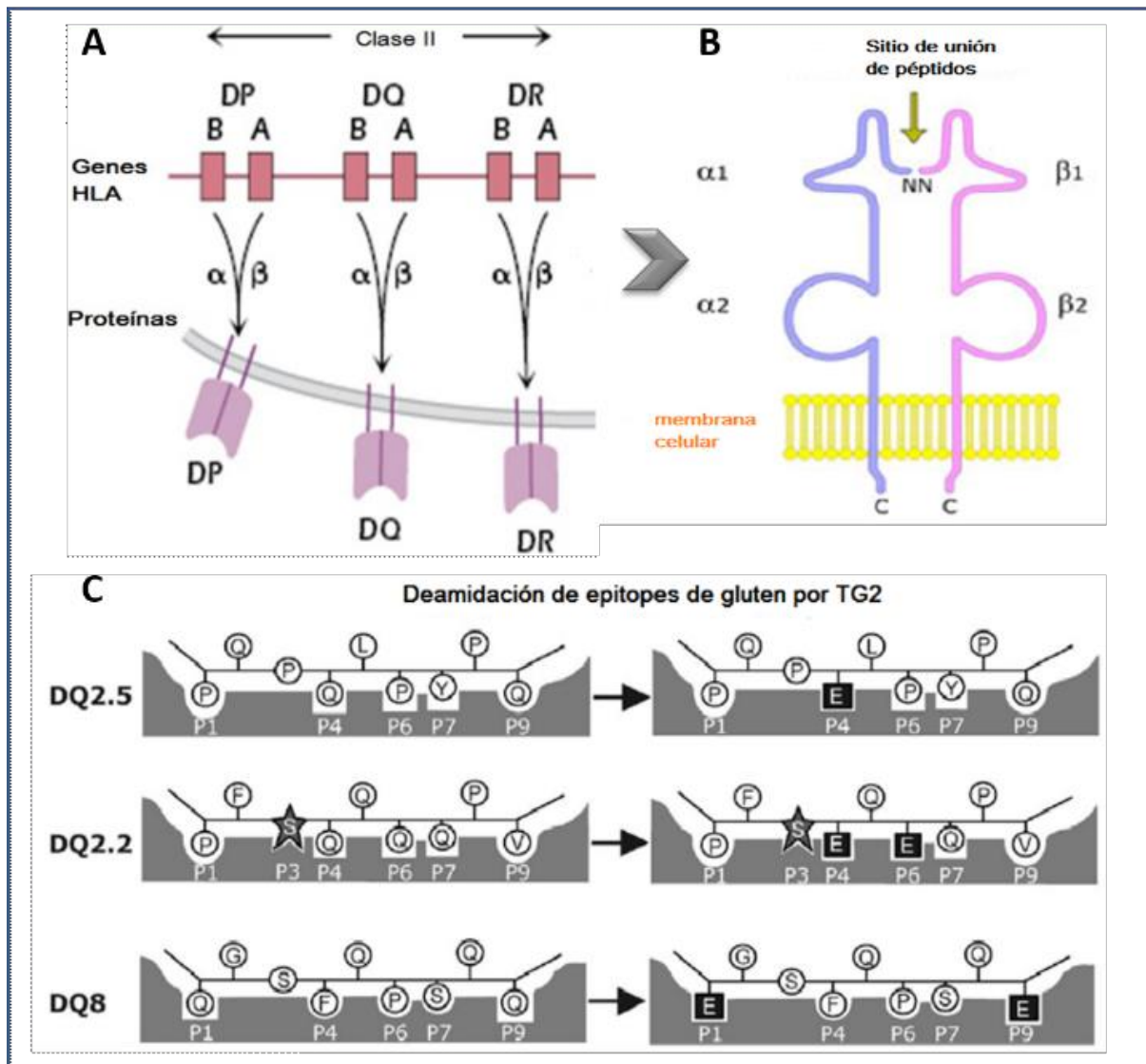


FIGURA 3. GENES Y MOLÉCULAS DE HLA IMPLICADAS EN ENFERMEDAD CELÍACA

**A.-** Genes HLA que codifican moléculas MHC de clase II. Heterodímero de HLA CLASE II. **B.-** Moléculas de HLA implicadas en la patología de EC. **C.-** Sitios de Unión de residuos cargados negativamente en moléculas de HLA clase II. (Figuras extraídas y modificadas de Sollid et al. 2017).

Cerf-Bensussan 2012). Se sabe que estas moléculas, tienen preferencia por péptidos derivados de gliadinas con cargas negativas (debido a la deamidación de glutaminas por parte de TG2), pero sus posiciones de anclaje varían, por lo que el conjunto de péptidos preferencialmente unido es diferente en cada caso. Estudios de unión de péptidos y

capacidad de activación de linfocitos T indican que el riesgo relativo de estas moléculas es diferente y en orden creciente de riesgo es DQ2.5, DQ8 y DQ2.2 (Figura 3C). Las diferencias entre las preferencias de las posiciones de anclaje, identificadas en la figura como P1 a P9 y la probabilidad de encontrar los péptidos apropiados a esos sitios ha llevado a establecer algoritmos de predicción de secuencias inmunogénicas que permiten explicar las diferencias del impacto de cada variante alélica en la susceptibilidad de EC (Johansen et al. 1996; Vartdal et al. 1996; Godkin 1997).

Sin embargo, es importante remarcar que estos alelos también pueden encontrarse en individuos sanos. Por lo tanto, si bien son necesarios para el desarrollo de la patología no son suficientes (Abadie et al. 2011). Es más, los genes HLA solo explican un 40% de la variabilidad genética en EC (Lundin y Sollid 2014). Diversos estudios realizados mediante GWAS (Hunt et al. 2008) describieron otros *locus* no asociados con HLA, capaces de explicar un 14% de la susceptibilidad genética (Lundin y Sollid 2014). Estos actúan como factores menores en la susceptibilidad a EC y podrían determinar otros aspectos de la patología, como formas de presentación y enfermedades asociadas. Se considera, además, que otros factores deben estar implicados como factores ambientales, infecciones virales, microbiota intestinal (De Silvestri et al. 2018), que describiremos a continuación.

### 3.2. Infecciones virales

Se han descrito asociaciones epidemiológicas entre infecciones virales y el desencadenamiento de EC (Abadie et al. 2011). En pacientes pediátricos se correlacionó mediante evidencia serológica la aparición temprana de EC con infecciones repetitivas con Rotavirus (Stene et al. 2006), Reportes recientes encontraron una asociación entre enterovirus y la aparición de EC (Kahrs et al. 2019).

En el 2017, el grupo de Bouziat et al. evidenció una relación entre infecciones víricas con reovirus y la pérdida de tolerancia al gluten (Bouziat et al. 2017). Los reovirus son virus de doble cadena de ARN (dsARN) que usualmente infectan a los humanos a lo largo de su vida (Tai et al. 2005). Este grupo utilizó dos virus para sus ensayos, un virus denominado T1L capaz de infectar el intestino, comprándolo con otra variante (T3D) que no era capaz de infectar. Estos estudios realizados en ratón emplearon el sistema de ovalbumina como antígeno dietario. Se mostró que TL1 pero no T3D, promueve un fenotipo inflamatorio. En aquellas células dendríticas que poseían antígenos dietarios, se produjeron IFNs tipo I, sobreexpresión de IRF1 que actuó promoviendo IL-12 e IL-27 en células dendríticas. Los autores mostraron que se producía un bloqueo de la conversión de células Treg y promovían una respuesta inmune del tipo Th1. Si bien se observó que los IFNs tipo 1 no eran requeridos para la ruptura de tolerancia, muy posiblemente contribuyan a la sobreexpresión de IRF1. Este grupo además comprobó que la infección con T1L, rompe la tolerancia oral al gluten e induce activación de TG2 en ratones transgénicos DQ8.

Por otro lado, está descripto que la expresión de  $IFN\alpha$  esta desregulada en pacientes celíacos (Monteleone et al. 2001; Di Sabatino et al. 2007; Ráki et al. 2013) que fue relacionada en estudios de GWAS a TLR7/TLR8, asociados con infecciones virales (Abadie et al. 2011). Se observó que la población celíaca tenía títulos mayores de anticuerpos anti-reovirus y mayores niveles de expresión de IRF1 que la población control. Se propuso un modelo, en donde los reovirus pueden dejar una marca permanente en el programa transcripcional del huésped (Virgin 2014) alterar la homeostasis intestinal, iniciar la pérdida de tolerancia oral e inducir una respuesta TH1 ante antígenos dietarios.

### 3.3. Disbiosis

El intestino humano contiene  $10^{14}$  microorganismos, con más de 1000 especies diferentes. Parte de estas comunidades tienen diversas funciones benéficas, aportando productos metabólicos, que nuestro organismo no produce, induciendo la generación de un entorno regulatorio y estimulando la función del sistema inmune de mucosas. Además, compiten con los patógenos siendo una herramienta para el control de infecciones entéricas. El balance en la microbiota es crítico para el huésped, sin embargo si existe algún cambio en la composición microbiana (disbiosis) volverá vulnerable al intestino al ingreso e infección por patógenos.

La microbiota intestinal juega un rol importante en la correcta diferenciación del sistema inmune de mucosa intestinal, evidenciado mediante la utilización de ratones libres de gérmenes (GF) y gnotobioticos (M. Barone, Troncone, y Auricchio 2014; Junker et al. 2012). Estudios clínicos y en animales sugieren también que cambios en la colonización en etapas tempranas de la vida, aumentan la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias crónicas y sensibilidad hacia antígenos alimentarios (C.-Y. Kim et al. 2004; Wal et al. 1998; Molberg et al. 1998). Existen estudios que describen alteraciones en la composición microbiana intestinal en pacientes celíacos, algunas de las cuales se normalizan luego de que el paciente realiza una dieta libre de gluten (DLG)(Henderson et al. 2007). El grupo de la Dra. Verdu investigó si la composición de la microbiota era capaz de influenciar respuestas inmunes al gluten en un modelo murino de ratones que expresaban el gen humano DQ8 y observaron que en el caso de ratones libres de patógenos específicos (DQ8-SPF), que poseían una microbiota compleja desarrollaban una respuesta atenuada al gluten, cuando se los comparó con ratones GF y SPF convencionales (Galipeau et al. 2015). Los ratones germ free poseían mayor número de

IELs, más marcadores de citotoxicidad en los IELs, anticuerpos anti-gliadinas y una respuesta T específica de gliadinas. Es difícil establecer la secuencia de eventos, y hoy se desconoce si la disbiosis precede y promueve el desarrollo de EC, o si es consecuencia del desarrollo de EC (Verdu, Galipeau, y Jabri 2015).

La disbiosis se asocia a la activación de vías de la respuesta innata, como producción de IL-15 y de IFNs tipo I (S. M. Kim, Mayassi, y Jabri 2015), elementos poderosos en el control de la respuesta inmune local. En particular, si bien los IFNs tipo I están asociados a una respuesta antiviral, se conoce que las bacterias también pueden inducirlos (Perry et al. 2005).

En la actualidad, se continúa investigando acerca de los factores de riesgo en EC, se especula que en sujetos con moderada susceptibilidad genética, la microbiota podría ser un factor que incrementa el riesgo a EC.

## ***4. Modelos animales para el estudio de Enfermedad Celíaca***

A pesar de los esfuerzos realizados, hasta el momento no se ha logrado desarrollar un modelo animal que reproduzca las principales características de los cambios histológicos, moleculares y celulares observados en EC. Como sucede en otras patologías, estos modelos resultan de mucha utilidad, aunque debe reconocerse que solo reproducen aspectos parciales de la patogenia en estudio.

Los primeros modelos animales emplearon una raza especial de perros (Setter Irlandés) (Polvi et al. 1997; Hall et al. 1992; Batt, Carter, y McLean 1984) o mono Rhesus (Mazumdar et al. 2010; Bethune, Borda, et al. 2008; Bethune, Ribka, et al. 2008). Estos modelos animales fueron capaces de desarrollar enteropatía dependiente de gluten, caracterizada por disminución de las vellosidades intestinales y aumento en el infiltrado

linfocitario. Sin embargo, estos animales no permitieron profundizar otros aspectos de la respuesta inmune y claramente no eran adecuados para hacer estudios experimentales sistemáticos.

Diferentes aproximaciones experimentales en modelos animales fueron desarrolladas (muchas de las cuales se describirán en detalle más adelante). Para dar un ejemplo, se relacionó la alta expresión de IL-15 observada en pacientes celíacos, con la posibilidad que esta citoquina fuera un factor relevante en el modelo murino. Para esto, se generaron líneas murinas transgénicas que sobre-expresaban IL-15 en enterocitos vía un promotor de tejido. En este modelo, se observó inflamación en duodeno y yeyuno, atrofia de vellosidades e infiltrado linfocitario. Sin embargo, la respuesta no fue específica de gluten (Ohta et al. 2002). Otro grupo desarrolló ratones dobles transgénicos que sobre-expresaban IL-15 y eran HLA-DQ8 (Abadie et al. 2011). En este caso, se generaron células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  específicas de gluten con aumento en el número de IELs, pero no se observó la presencia de atrofia vellositaria en estos animales.

Como sabemos, la respuesta inmune adaptativa específica de gliadinas es el factor determinante de EC. Por lo tanto, con el fin de demostrar el rol de las células T CD4<sup>+</sup> específicas de gluten, se desarrolló un modelo murino de transferencia de células T activadas específicas de gliadinas. Aunque este modelo murino reprodujo aspectos claves como cambios histológicos en intestino delgado luego de la administración oral de gluten, no permitió evaluar el rol de las moléculas de HLA-DQ2/8 (Freitag et al. 2009).

Para abordar la implicancia de las moléculas de MHC clase II, se obtuvieron ratones transgénicos con las moléculas HLA de susceptibilidad: HLA-DQ8 (Black, Murray, y David 2002) o HLA-DQ2 (Pré et al. 2011; de Kauwe et al. 2009). Si bien, en estos modelos se inducían respuestas de células T específicas de gliadinas y producción de anticuerpos, fallaron en la generación de enteropatía o atrofia vellositaria.



Posteriormente, se desarrollaron ratones transgénicos DQ8 en un entorno de susceptibilidad para el desarrollo de autoinmunidad (NOD-DQ8)(Galipeau et al. 2011; de Kauwe et al. 2009; E. Marietta et al. 2004). En un trabajo en colaboración, empleando los ratones NOD-DQ8, nuestro grupo mostró el rol de las células T regulatorias (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup>) en la inducción de la enteropatía (Galipeau et al. 2011). A pesar de haberse generado una respuesta inmune específica, no se observó daño en la mucosa intestinal (atrofia vellositaria). Estas observaciones, comenzaron a construir parte de la hipótesis de nuestro trabajo (desarrollada más adelante): una respuesta inflamatoria exacerbada y/o sostenida en el tiempo es necesaria para el desarrollo de la enteropatía en un individuo genéticamente susceptible.

## ***5. Mecanismos de muerte celular asociados a Enfermedad Celíaca***

El epitelio intestinal se renueva muy rápidamente. Las células proliferan en las criptas y siguen un camino de diferenciación hacia la punta de la vellosidad. Allí se produce una muerte celular programada que permite una renovación constante. En condiciones homeostáticas este proceso es muy controlado, ya que la barrera epitelial debe conservar su integridad, a pesar de la muerte del enterocito,. Uno de los rasgos característicos de EC es la reducción de la altura de las vellosidades en intestino delgado proximal. Esto se ha relacionado con la muerte masiva de enterocitos. Los modelos utilizados consideran que esta muerte es consecuencia de la actividad citotóxica de los IELs (S. M. Kim, Mayassi, y Jabri 2015). En los IELs, se encuentran tres poblaciones mayoritarias de células: linfocitos con TCR  $\alpha/\beta^+$  CD8<sup>+</sup>, linfocitos con TCR  $\gamma/\delta^+$  y células NK. Aunque solo en el caso de los linfocitos TCR  $\alpha/\beta^+$  CD8<sup>+</sup> pudo observarse una respuesta específica (Mandile et al. 2017; Mazzarella et al. 2008). En conjunto, estas células son

activadas por IFNs tipo I e IFN $\gamma$ , reconocen señales de estrés celular expresadas por los enterocitos y son inductores de apoptosis de enterocitos (Olaussen et al. 2002). La apoptosis se produce por señales generadas por receptores de activación presentes en los IELS (como NKG2D) y la actividad de perforina y granzimas (Sabatino et al. 2001), así como la participación del eje FAS/FASL (Claudio Giovannini et al. 2003). Si bien este es el modelo más aceptado, la confirmación experimental de estos mecanismos es escasa y es probable que existan otros procesos que participen en la muerte celular en la mucosa intestinal.

## ***6. Gluten y prolaminas***

El factor ambiental desencadenante de esta patología es un grupo de proteínas de alta homología, presentes en el endosperma de los granos de trigo, cebada y centeno. Por cuestiones culturales, en nuestra alimentación se emplea mayoritariamente trigo, razón por la cual, en general se refiere a este cereal como el factor de la dieta que determina la inducción de EC. En el caso de trigo, estas proteínas se clasifican de acuerdo con sus características de solubilidad (Osborne 1924). Como se muestra en la Tabla 1, siguiendo una extracción secuencial se pueden obtener las fracciones: albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas.

Los péptidos derivados de las fracciones gliadinas y gluteninas son los que generan el desarrollo de EC. Estas proteínas, representan entre un 80 – 85 % del total de las proteínas de la harina de trigo, tienen muy baja solubilidad en medios acuosos, lo que entre otros efectos, hace difícil trabajar con ellas en ensayos biológicos. Estas fracciones a su vez pueden ser subdivididas. La separación en electroforesis a pH=3, permite separar las gliadinas en:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ , de acuerdo con su movilidad decreciente. Mientras que las gluteninas se separan en LMW y HMW (de las siglas en inglés, correspondientes a bajo y

alto peso molecular). Gliadinas y gluteninas tienden a agregarse y a unirse covalentemente mediante puentes disulfuro. Son las únicas proteínas en la naturaleza con la propiedad de formar una estructura viscoelástica, denominada gluten que es capaz de entrapar gas (Peter R. Shewry y Halford 2002; P. R. Shewry, Napier, y Tatham 1995).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS DE TRIGO

Solubilidad	Fracción	Subfracción por separación electroforética
<b>Agua</b>	Albuminas	-
<b>Soluciones salinas</b>	Globulinas	-
<b>Etanol 40-70%</b>	Gliadinas	$\alpha/\beta, \gamma, \omega$
<b>Agentes reductores y desnaturalizantes</b>	Gluteninas	LMW y HMW (bajo y alto peso molecular, respectivamente)

Gliadinas y gluteninas es un conjunto complejo de proteínas con alta homología y polimorfismo. Pueden encontrarse hasta 150-200 proteínas diferentes en una variedad de trigo (P. R. Shewry et al. 1988; Veraverbeke y Delcour 2002). Las proteínas del gluten conforman una red, cuya elasticidad está determinada por los enlaces disulfuro intermoleculares entre las gluteninas, mientras que la viscosidad está determinada por la fracción monomérica de gliadinas, teniendo en cuenta solamente enlaces disulfuro intramoleculares.

Dado que el gluten posee una gran cantidad de secuencias peptídicas repetitivas conteniendo aminoácidos como prolina y glutamina, es difícilmente degradado por las enzimas del tracto gastrointestinal (Hausch et al. 2002). De esta forma, péptidos largos puedan llegar al lumen intestinal y desencadenar luego una respuesta inmune que en individuos genéticamente susceptibles conducirá al desarrollo de EC (M. Barone, Troncone, y Auricchio 2014).

## **7. Péptido p31-43**

Como mencionamos, a diferencia de los péptidos inductores de respuesta adaptativa existen otros péptidos, que no se unen a moléculas de HLA y generan una respuesta inflamatoria. El más estudiado es el p31-43 (LGQQQPFPPQQPY). Estudios *in vitro* han mostrado que 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 (Zimmermann et al. 2014; M. Barone, Troncone, y Auricchio 2014). Esto provoca estrés celular y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Frossi et al. 2017; Luciani et al. 2010), induce apoptosis, aumento de permeabilidad y modificaciones de filamentos de actina (Iacomino et al. 2013; Maiuri et al. 2003; Clemente et al. 2003). Ensayos empleando piezas de biopsias duodenales mostraron que el tratamiento con p31-43 inducía una respuesta innata (indicada por la expresión de IL-15, CD38, y ciclooxigenasa 2, (COX-2) así como también apoptosis de enterocitos (Maiuri et al. 2003). Se profundizará en los efectos de p31-43, *in vitro e in vivo*, en los capítulos I y II respectivamente.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## **Hipótesis y objetivos**

### ***Hipótesis general***

“Los péptidos de gliadinas inducen mecanismos de la respuesta innata en un modelo experimental murino de enteropatía.”

### ***Objetivo general***

Nuestro objetivo principal es estudiar etapas tempranas de la respuesta inmune innata en Enfermedad Celíaca mediante un modelo murino de enteropatía desencadenada por un péptido derivado de gliadinas, p31-43. Se utilizará un modelo murino de enteropatía mediante administración de p31-43 por vía intraluminal y se desarrollará un modelo mediante administración del péptido por vía oral. Se busca evaluar la inducción de una respuesta inmune innata *in vivo* a tiempos cortos y evaluar si el daño es específico de la secuencia de aminoácidos de p31-43. Por otro lado, se estudiarán las vías de señalización implicadas en la enteropatía. Dado que no se ha identificado el receptor de p31-43, nos preguntamos cual es el mecanismo que origina esta capacidad de inducir respuesta inflamatoria. Es por eso que se analizarán aspectos estructurales de p31-43, de modo de evaluar si adopta conformaciones que permitan explicar las propiedades de daño.





## CAPÍTULO I

# MODELO MURINO DE ENTEROPATÍA INDUCIDA POR EL PÉPTIDO p31-43



# Capítulo I: Modelo murino de enteropatía inducida por el péptido p31-43

## 1. Introducción

En la actualidad no existe un único modelo animal de Enfermedad Celíaca capaz de reproducir todas las características de la patología. Se han desarrollado diversos modelos que contribuyeron de manera parcial a entender el rol de distintas moléculas y células claves en la patogenia de EC. Es relevante la generación de nuevos modelos animales, que permitan evaluar estrategias terapéuticas y profundizar en el conocimiento de los mecanismos de esta enfermedad.

Algunos animales como caballos, perros y monos Rhesus desarrollan enteropatía dependiente de gluten de manera espontánea, con atrofia vellositaria parcial, aumento en el número de Linfocitos Intraepiteliales (IELs), y en la permeabilidad intestinal y, sólo en el caso de los monos, producción de anticuerpos anti-TG2 (E. V. Marietta y Murray 2012). Por otro lado, se intentó desarrollar un modelo inducible de EC en Ratas Wistar AVN, libres de microorganismos, a las que se les administró gluten en dosis crecientes durante dos meses y se observó que los animales presentaron atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas, así como también mayor número de IELs (Tlaskalová-Hogenová et al. 2004). Sin embargo, estos fenómenos fueron independientes de la presencia de los alelos de susceptibilidad de HLA tipo II y dado que estos contribuyen al 40% de predisposición genética en humanos, no resultaron útiles para el estudio de la patología.

El primer modelo animal en demostrar la función de las células T CD4<sup>+</sup> en la patología fue desarrollado por Freitag y col. 2009 utilizando ratones RAG1<sup>-/-</sup> que se encontraban en dieta libre de gluten (DLG) a los que se les transfirieron células T que

previamente habían sido estimuladas *in vitro* con gliadinas. Estos ratones presentaron cambios morfológicos intestinales, como atrofia de vellosidades e hiperplasia de criptas cuando recibieron gluten por vía oral (Freitag et al. 2009). Este modelo fue exitoso en lograr inducir un daño dependiente de moléculas de MHC II murino. Para estudiar el aporte de la susceptibilidad genética a la predisposición de EC, se desarrollaron complejas líneas de ratones transgénicos que posean genes, HLA-DQ2 y HLA-DQ8. En primer lugar, para analizar la contribución de moléculas HLA-DQ8, se obtuvieron ratones HLA-DQ8 transgénicos a los que se les inyectaron gliadinas y adyuvante de Freund. Luego de la administración de gluten por vía oral durante 3 semanas, se pudo observar proliferación de células T, acumulación de IELs y anticuerpos anti-gliadina. Sin embargo, no se observaron signos de atrofia vellositaria (Black, Murray, y David 2002).

En segundo lugar, para abordar el estudio de la susceptibilidad genética a moléculas HLA-DQ2, un modelo utilizó ratones que expresaban HLA-DQ2 humano, con linfocitos T con receptores TcR humanizados y específicos de gliadina. Se observó que cuando se administró ovoalbúmina (OVA) como antígeno dietario, se produjo una respuesta específica y se indujeron células T<sub>reg</sub> FoxP3<sup>+</sup>. La ingestión de gliadina deamidada indujo proliferación de células T, que produjeron tanto IFN  $\gamma$  como también IL-10 (Pré et al. 2011). Otros modelos murinos utilizaron ratones que carecían de MHC II endógeno y eran transgénicos para CD4<sup>+</sup> humano y los haplotipos HLA-DR3-DQ2. Estos animales recibieron una inmunización con un péptido de  $\alpha$ -gliadina y se generaron células T CD4<sup>+</sup> HLA-DQ2 restringidas específicas. Sin embargo, ante la exposición oral al gluten, los animales no desarrollan enteropatía.

Otro modelo transgénico complejo, involucra animales que expresan el haplotipo HLA-DR3-DQ2, que poseen células T CD4<sup>+</sup> humanas y generados en un background NOD, pero que tampoco desarrollaron patología luego del consumo de gluten. Estos modelos

de ratones humanizados indicaron que la ingestión de gluten pudo ser tolerada sin que se desarrolle patología intestinal. Esto implica que otros factores adicionales son necesarios para el desencadenamiento de la EC (de Kauwe et al. 2009).

Por otro lado, se buscó estudiar la implicancia de IL-15, una citoquina que se encuentra sobre expresada en pacientes con EC e interviene en procesos de daño en el epitelio. Para esto se generaron líneas transgénicas murinas. Una de ellas, llamada *h IL-15Tge*, expresaba una forma soluble de IL-15 humana bajo un promotor específico para enterocitos en ratones con TcR específico de OVA. Estos ratones presentaron retraso en el crecimiento, atrofia vellositaria y expansión de células TCD8<sup>+</sup> granzimas B<sup>+</sup>. En este modelo, se demostró la reactividad frente a un antígeno dietario (Costes et al. 2015). Por otro lado, se trabajó con animales provenientes de la cruce de ratones HLA-DQ8 con animales que sobre expresaban IL-15 bajo el control de un promotor ubicuo (H2-D<sup>d</sup>), que fueron alimentados con gliadinas durante 10 días. Aunque no se observó daño intestinal, presentaron niveles incrementados de anticuerpos anti-gliadinas y anti-TG2, aumento de la frecuencia de células T productoras de IFN $\gamma$ , aumentó el número de IELs y se observaron defectos en la capacidad de generar células T regulatorias FoxP3<sup>+</sup> (Abadie et al. 2011).

Como podemos observar, existen múltiples modelos que estudian diferentes aspectos de la EC de forma segregada, en particular la respuesta T específica. Sin embargo, no se ha desarrollado aún un modelo *in vivo* que permita estudiar los mecanismos efectores de daño intestinal y las vías de señalización. Los modelos animales para el estudio de etapas iniciales de la enteropatía son herramientas útiles para estudiar los mecanismos tempranos en la patogenia de EC sobre los que no podemos tener información a partir de muestras humanas, ya que el paciente que se diagnostica posee la enfermedad activa hace un tiempo prolongado y variable. Además, estos modelos

permiten profundizar en el conocimiento de mecanismos básicos involucrados en la patología de manera de poder desarrollar nuevas estrategias preventivas y de tratamiento.

Nuestro grupo de trabajo desarrolló un modelo de enteropatía murino que nos permitió evaluar inductores de la respuesta innata en ratones C57BL/6 (Araya et al. 2016, 2014). El diseño experimental consistió en la administración intraluminal, en intestino delgado proximal mediante una técnica de microcirugía, de estímulos de la respuesta innata (Poly I:C) o de p31-43. Luego de 12 horas post-administración se realizó un análisis morfométrico en el intestino proximal, para evidenciar por primera vez *in vivo*, que la administración de estos inductores era capaz de inducir enteropatía intestinal.

En este capítulo, utilizando el modelo de enteropatía tanto por administración de p31-43, por vía intraluminal como por intragástrica, profundizaremos el estudio de las vías de señalización, estrés y muerte celular involucradas en el daño intestinal, así como la selectividad de la respuesta frente a p31-43. Además, se empleará un modelo con ratones NOD-DQ8 para estudiar el efecto de p31-43 en un contexto genético de autoinmunidad y susceptibilidad genética.

## **2. Hipótesis**

La inoculación de p31-43 en el lumen intestinal de ratones C57BL/6 desencadena mecanismos de la inmunidad innata que conducen al daño de la mucosa intestinal y predisponen a una mayor respuesta frente al desafío con gluten en ratones genéticamente susceptibles.

## **3. Objetivos específicos**

- ❖ Establecer un modelo de enteropatía inducido por administración intraluminal o intragástrica del péptido de gliadinas p31-43.
- ❖ Determinar si la enteropatía inducida por p31-43 en el intestino delgado murino es específica de la secuencia del péptido.
- ❖ Estudiar las vías de señalización de la respuesta innata involucradas en el daño inducido por p31-43.
- ❖ Evaluar el impacto del daño en la mucosa intestinal causado por p31-43 sobre la respuesta inmune específica ante un desafío posterior.

## 4. Resultados

### 4.1. Sección I: Evaluación de los efectos inducidos por administración intraluminal de p31-43 en un modelo murino

Debido a que las gliadinas poseen una alta proporción de prolina y glutamina son difícilmente digeridas por enzimas del tracto digestivo y se generan péptidos bioactivos que son capaces de llegar al lumen intestinal e inducir respuestas tanto adaptativas como innatas (M. Barone, Troncone, y Auricchio 2014). Entre los péptidos resistentes a degradación se encuentra el péptido 33-mer p55-87 que puede unirse a HLA-DQ2/DQ8 e inducir una respuesta mediada por células T proinflamatorias (Th1). Por otro lado, se encuentra el péptido 13-mer p31-43, que no se unen a MHC clase II y por lo tanto, no es reconocido por células T (Calvanese et al. 2019; R. P. Anderson et al. 2000; Arentz-Hansen et al. 2000).

El péptido p31-43 ha sido ampliamente estudiado *in vitro* y se le han asociado múltiples efectos biológicos, tanto en líneas celulares (Zimmermann et al. 2014; M. Barone, Troncone, y Auricchio 2014; Maria Vittoria Barone et al. 2010; Maiuri et al. 2003) como en cultivos *ex vivo* de biopsias de pacientes con EC (Paolella et al. 2017; Maria Vittoria Barone et al. 2007; Clemente et al. 2003). Los estudios *in vitro* demostraron que el p31-43 es capaz de ingresar a las células y ubicarse en vesículas tempranas ocasionando retraso en su maduración y estrés celular; induce aumento de proliferación de enterocitos dependiente de EGF (Epidermal Growth Factor); aumento de expresión mRNA de IL-15; muerte celular de enterocitos y estrés oxidativo (Luciani et al. 2010). Un estudio reciente del grupo de Nanayakkara, establece que el péptido p31-43 imita y aumenta la respuesta innata ante virus e interfiere con el tráfico endocítico (Nanayakkara et al. 2018). En este capítulo, utilizando un modelo murino de enteropatía, evaluamos si



el péptido de  $\alpha$ -gliadinas (p31-43) es capaz de activar mecanismos de la respuesta inmune innata en la mucosa intestinal *in vivo*.

#### *4.1.1. Estudios realizados en un modelo murino con administración intraluminal de p31-43 por microcirugía*

##### 4.1.1.1. Optimización del protocolo experimental

Como se mencionó previamente, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo de enteropatía por administración intraluminal de p31-43 (Araya et al. 2016, 2014). Se realizaron micro-cirugías con sobrevida en ratones C57BL/6 a los que se les inyectó un estímulo directamente sobre la primer asa del intestino delgado a 2 cm por debajo del estómago, luego se suturó la cavidad abdominal y se monitoreó el animal hasta su completa recuperación. En la descripción original de este procedimiento se empleaba anestesia inyectable fija utilizando Ketamina (80 mg/kg peso) y Xilacina (10 mg/Kg peso). Esta técnica posee la ventaja principal de que no se necesita un equipamiento especializado. Sin embargo, entre sus principales desventajas se encuentra el hecho de que una vez que se administra la dosis, esta no puede ser modificada y existe variabilidad en la respuesta de cada animal. Además, los agentes anestésicos utilizados causan depresión respiratoria en los animales, lo cual aumenta la mortalidad si no se cuenta con una oxigenación adecuada (Flecknell 2015). Finalmente, desde lo experimental observamos que la recuperación del animal luego de la cirugía se prolongaba normalmente por 50-60 minutos.

Con el fin de mejorar el bienestar animal, decidimos optimizar el proceso de inducción utilizando anestesia inhalatoria. Las cirugías se realizaron utilizando Isoflurano como anestésico (0,5 - 1 %). El Isoflurano es uno de los anestésicos más utilizados, ya que produce rápidamente la inducción y recuperación del plano anestésico

en el animal. Además, es un agente no irritante, no explosivo, no inflamable, que no se metaboliza y es completamente eliminado al ser exhalado. En cuanto a las desventajas podemos mencionar que esta técnica es más costosa y requiere de equipamiento específico para inducción del plano anestésico y para la extracción de los gases de desecho (Flecknell 2015). Sin embargo, la principal ventaja de la utilización de esta metodología es que posee una sobrevivencia de más del 90 %. Luego de la cirugía, se empleó un analgésico local como Lidocaina (2 %) para minimizar el dolor post quirúrgico en la zona donde se encuentra la sutura. Para aumentar la bioseguridad del operador, se trabajó en una cabina de seguridad biológica tipo II, con equipo de aspiración y venteo hacia el exterior. En todos los casos, se emplearon animales C57BL/6 machos de 6-8 semanas de edad. Los protocolos experimentales fueron aprobados por la CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas (Protocolo 002-05-15 y 009-27-17).

Una vez establecido el protocolo de anestesia, evaluamos si el volumen inoculado intraluminalmente luego de 16 horas correspondía a la sección de intestino delgado utilizada en la recolección de muestras. Este es un control importante pues permite determinar la distancia mínima alcanzada por el volumen de solución de estímulo administrada y de esta forma, conocer cuál es la longitud del segmento de intestino que puede ser procesada para los estudios posteriores (como histología, expresión de mediadores por qPCR, etc).

Para realizar este ensayo se empleó una solución del colorante Azul de Evans (EBD) a una concentración de 1% (p/v). Este colorante puede unirse a albúmina y no es permeable cuando las células están intactas. En presencia de daño en la membrana plasmática, el colorante es capaz de ingresar en el citoplasma y el núcleo tiñendo las células de color azul. Para esta evaluación, a los ratones se les administró el mismo volumen utilizado en el protocolo convencional de microcirugía (100µL) o el doble (200

$\mu\text{L}$ ). Luego de 16 horas, se procedió al sacrificio y a la recolección del intestino delgado completo. En la figura 4, se muestran imágenes representativas de intestino de los animales luego de 16hs post estimulación.

Se puede observar que luego de las 16hs, el colorante ha marcado 6,5 cm de intestino delgado cuando se administraron 100  $\mu\text{L}$  y 14,7 cm cuando se administraron 200  $\mu\text{L}$ . Desde este ensayo en adelante solo se tomaron como máximo 5 cm de intestino delgado para la colección de muestras.

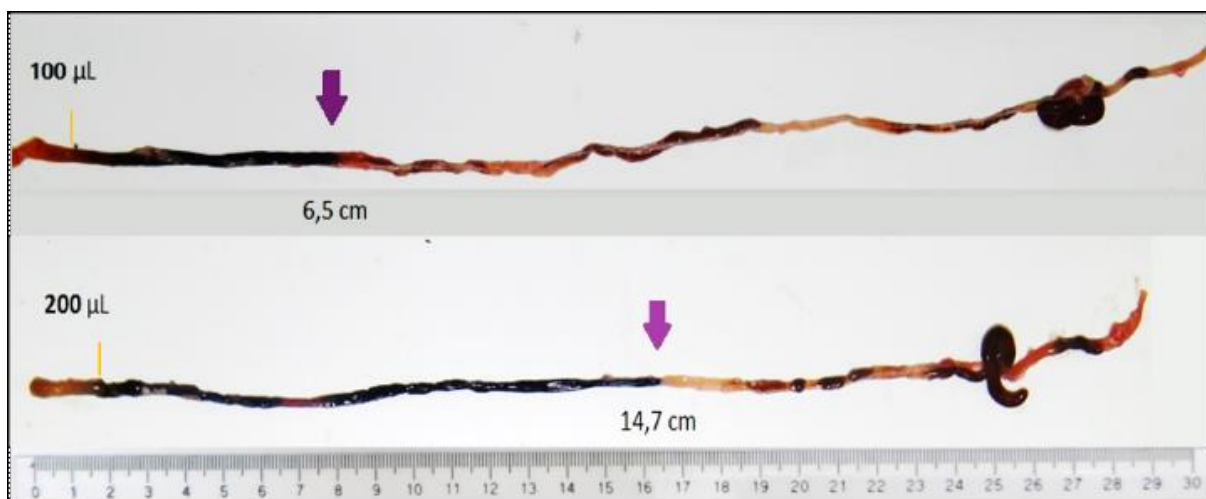


Figura 4. Inoculación intraluminal de colorante azul de Evans en ratones C57BL/6

Imágenes representativas de intestino delgado de ratones C57BL/6 luego de 16hs post inoculación intraluminal de una solución 1% (p/v) de Azul de Evans. Se muestran los intestinos delgados de ratones inoculados con 100  $\mu\text{L}$  o 200  $\mu\text{L}$ . Se usó una regla como referencia de la distancia alcanzada por el colorante

#### 4.1.1.2. Inducción de enteropatía en un modelo murino mediante inoculación intraluminal de p31-43

##### 4.1.1.2.1. Validación del modelo murino

##### 4.1.1.2.1.1. Inducción en ratones C57BL/6

De acuerdo con el protocolo optimizado, esquematizado a continuación (Figura 5), se realizaron microcirugías en ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad, a los que se les inyectó intraluminalmente, a 2 cm del estómago, 100µL de una solución de péptido p31-43 (LGQQPFPPQQPY), un péptido no relacionado (PNR) (LDPLIRGLLARPACALQV) o PBS como control de vehículo.

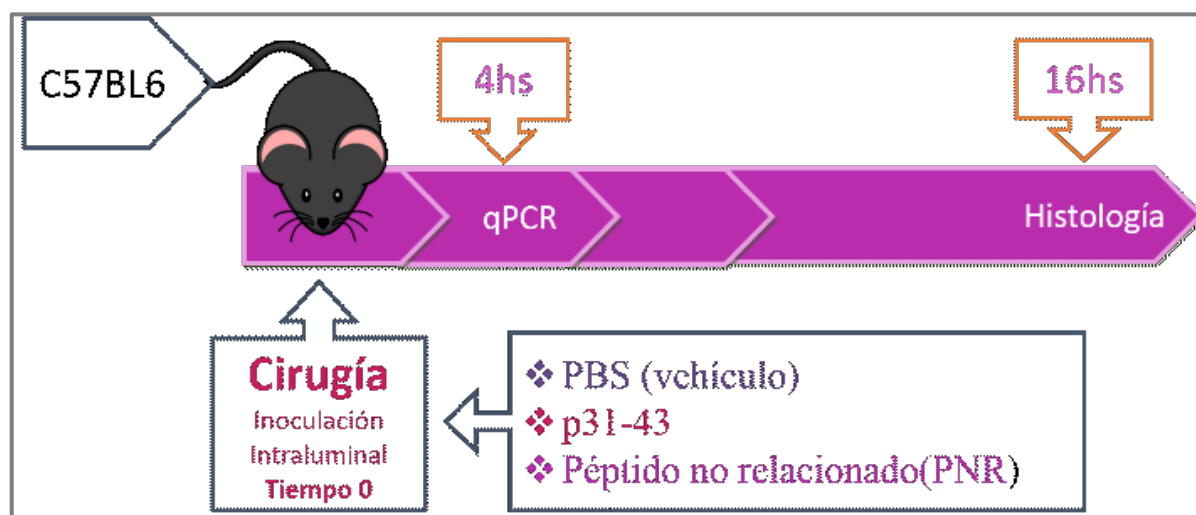


FIGURA 5. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRALUMINAL DE P31-43 DE RATONES C57BL/6

Se utilizaron ratones C57BL/6 de 7 a 8 semanas de edad a los que se les realizó una microcirugía con sobrevida para inocular p31-43 (1 µg/ratón o 10µg/ratón), péptido no relacionado (PNR) o PBS (vehículo). Para analizar la expresión de mediadores proinflamatorios se sacrificaron los animales luego de 4 horas y se tomaron muestras de intestino delgado. Por otro lado, con el objetivo de evaluar la inducción de enteropatía intestinal, se tomaron muestras luego de 16 horas de la administración intraluminal.

Se evaluaron los tratamientos con los péptidos a dos dosis: 1  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ . Luego de 16 horas de la inoculación intraluminal se colectaron los intestinos y se tomó el tercio proximal para la evaluación histológica. En los cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) se realizó un análisis morfométrico, en el que se midió la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas (relación V/C), así como el número de IELs.

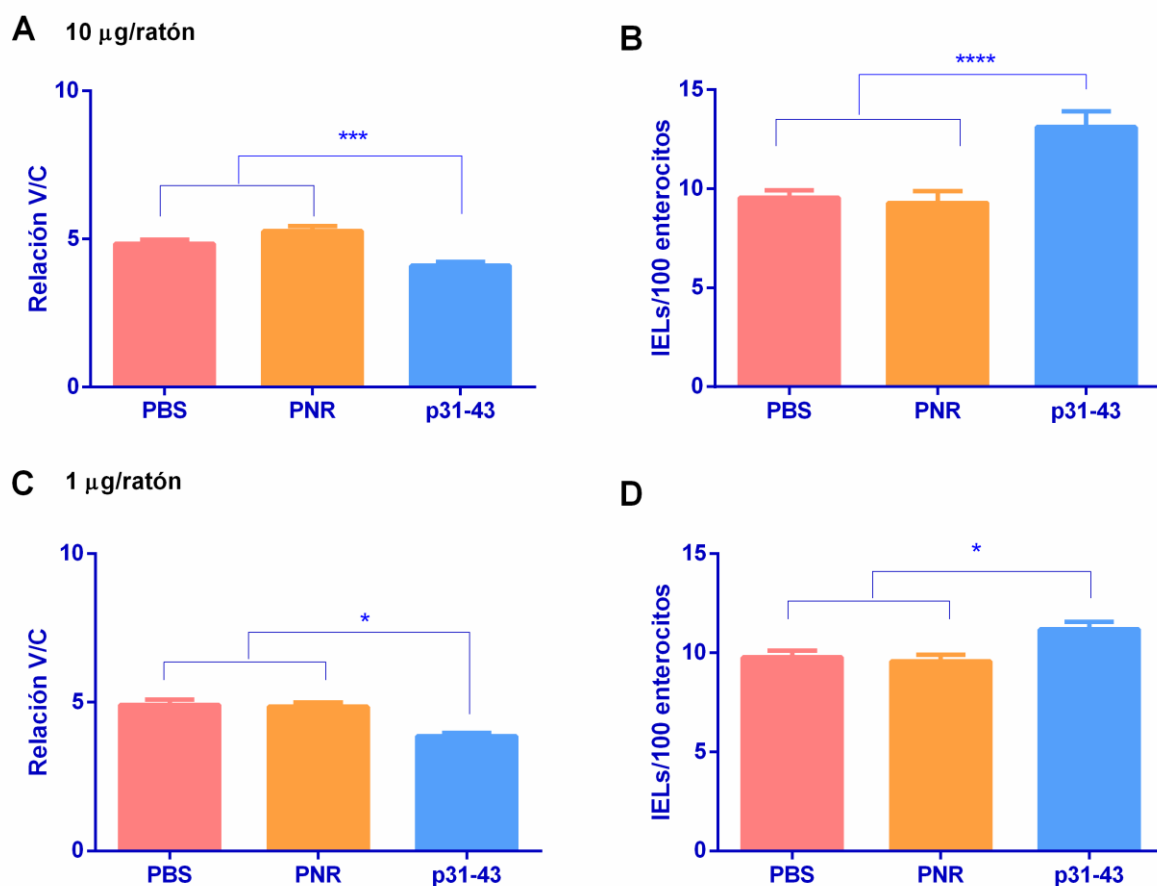


FIGURA 6. EL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 INDUCE DAÑO EN LA MUCOSA INTESTINAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO EN C57BL/6

Análisis morfométrico de secciones de intestino delgado proximal de ratones C57BL6 tratados con p31-43, PNR o PBS. **A.-** Análisis de la relación longitud de la vellosidad/profundidad de la cripta (relación V/C). **B.-** Recuento de Linfocitos Intraepiteliales (IELs) cada 100 enterocitos en 10 puntas de vellosidades al azar, en secciones de intestino de animales tratados con 10  $\mu\text{g}/\text{Ratón}$  16 h post tratamiento. **C.-** Análisis de la relación V/C y recuento de IELs, en secciones de intestino de animales tratados con 1  $\mu\text{g}/\text{Ratón}$ . Los resultados se presentan como la media  $\pm$ SEM de N=5 ratones por grupo y son representativos de 3 experimentos. Test: Anova. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ . Post test-Bonferroni.

Mediante el análisis morfométrico, observamos que el tratamiento con una dosis de 10 µg/ratón de p31-43 produce reducción de la relación V/C (Figura 6 A), y aumento en el número de IELs (Figura 6 B) que son significativos comparados con los tratamientos con PNR o PBS. Luego, decidimos evaluar si una dosis 10 veces menor (1 µg/ratón), era capaz de producir efectos similares. Observamos que si bien, las diferencias son menos marcadas, continúan siendo estadísticamente significativas (Figuras 6 C y D).

De este primer ensayo podemos concluir que el p31-43 tiene un potente efecto biológico, ya que aun en dosis 10 veces menores (1 µg/ratón) a las usadas en protocolos anteriores, es posible evidenciar daño en la mucosa intestinal.

#### *4.1.1.2.1.2. Inducción de enteropatía en ratones BALB/c*

En esta sección nos interesó evaluar si el modelo de enteropatía podía ser reproducido en ratones de una cepa diferente y pertenecientes a otro bioterio. Para esto, en ratones macho de la cepa BALB/c, se realizó un protocolo de administración intraluminal de p31-43 o PNR (10 µg/ratón) y 16h post estímulo se procedió al sacrificio y a la recolección del intestino delgado para la realización de un análisis morfométrico. En los ratones BALB/c tratados con p31-43 se observó una disminución en la relación V/C (Figura 7 A), así como también un incremento en el número de IELs (Figura 7 B).

Es de destacar que estos ensayos se desarrollaron durante una pasantía que realicé en el laboratorio de la Dra. Caetano Faría (Universidad de Mina Gerais, UFMG, Brasil) y los animales provinieron del Bioterio Central de la Universidad de Mina Gerais.

## BALB/c

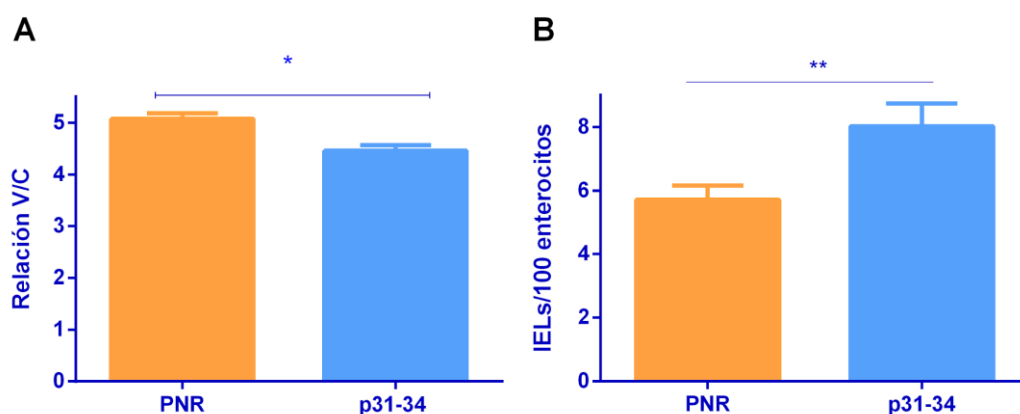


FIGURA 7. EL PÉPTIDO P31-43 INDUCE DAÑO EN LA MUCOSA INTESTINAL EN RATONES BALB/c

Análisis histológico de cortes de intestino delgado de ratones BALB/c 16h post administración intraluminal de PNR o de p31-43 (10  $\mu$ g/ratón). **A.**- Análisis de la relación V/C. **B.**- Recuento de IELs. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ SEM de N=5 ratones por grupo. Estadístico: test T-Student. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

La relevancia de estos resultados radica en que nuestro modelo de enteropatía puede ser replicado en animales de otras cepas y colonizados con una microbiota diferente. Esto es de suma importancia ya que posibilita trasladar este modelo a otros laboratorios y el uso de ratones de cepas diferentes.

### 4.1.1.2.2. Especificidad de secuencia del daño inducido por p31-43

Habiendo mostrado la inducción de enteropatía por p31-43 en el modelo murino, nos interesó verificar si la respuesta observada *in vivo* era debida estrictamente a su secuencia de aminoácidos. Como mencionamos, las gliadinas tienen alto contenido en

prolina y glutamina en secuencias repetitivas y dado que no se ha encontrado un receptor para p31-43 (Paoletta et al. 2018) este estudio resulta de relevancia.

Para esto se utilizó el diseño experimental descrito en la figura 5. Se realizaron microcirugías en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad y se les inyectó intraluminalmente 100  $\mu$ L de una solución de 1  $\mu$ g/ratón de diferentes péptidos de síntesis: p31-43 o dos péptidos que poseían la misma composición aminoacídica pero diferente secuencia, uno con secuencia invertida (Pinv) y otro con secuencia al azar (Pazar).

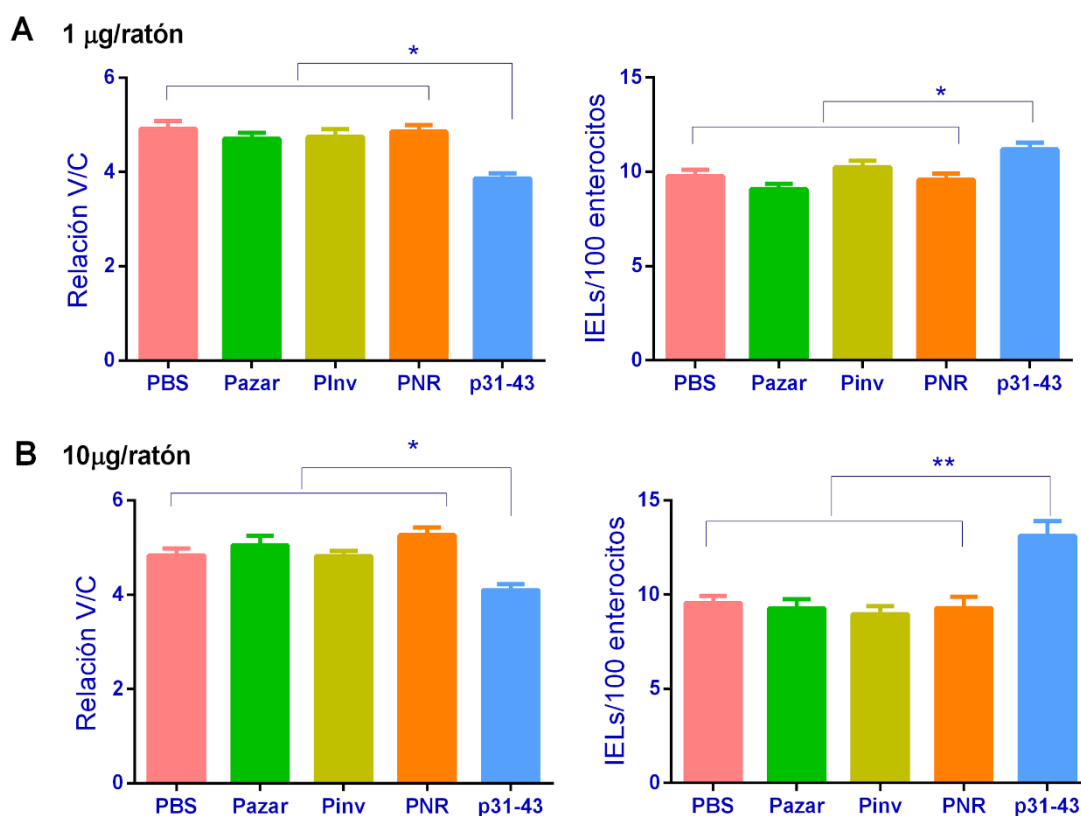


FIGURA 8. EL PÉPTIDO DE GLIADINAS p31-43 INDUCE DAÑO SECUENCIA-ESPECÍFICO EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATONES C57BL/6

**A.-** Análisis de la relación V/C y recuento del número de IELs en animales tratados por vía intraluminal con soluciones de péptidos a una dosis de 10  $\mu$ g/ratón, 16 h post estímulo. **B.-** Análisis de la relación V/C y recuento del número de IELs en animales tratados por vía intraluminal con soluciones de péptidos a una dosis de 1  $\mu$ g/ratón, 16 h post estímulo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ SEM de N=5 ratones por grupo. Estadístico: Test de Anova. \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .



Se tomaron muestras de intestino delgado a 4 o 16 h post administración, para la evaluación de la expresión de mediadores proinflamatorios, utilizando PCR cuantitativa y la evaluación morfométrica respectivamente.

En la Figura 8A se presenta el recuento de IELs y la relación V/C en animales tratados con soluciones de péptidos a 1 µg/ratón, ya que era la menor concentración con la cual se evidenció enteropatía en el modelo. Se observó que sólo los ratones tratados con p31-43 presentaron una marcada disminución de la relación V/C y un mayor número de IELs.

Por otro lado, repetimos el ensayo anterior evaluando una dosis de 10 µg/ratón de los péptidos de síntesis y se observó que, aún a una concentración diez veces mayor, sólo el grupo de ratones tratados con p31-43 fue capaz de inducir parámetros morfométricos característicos de daño (Figura 8 B). Este resultado demuestra que el daño en la mucosa intestinal es específico de la secuencia de aminoácidos de p31-43.

En estudios previos, observamos que la expresión a nivel de mRNA de IFN $\gamma$ , IFN $\beta$  y CXCL10, era inducida por p31-43 a tiempos muy cortos (4h post administración). Tomando esta información, decidimos utilizar la medida de estos parámetros más sensibles para evaluar el efecto específico de la secuencia de p31-43. Para esto, se analizó la expresión de estos mediadores proinflamatorios en animales C57BL/6 tratados con los diferentes péptidos de síntesis.

En la Figura 9A, se puede observar que la expresión de IFN $\beta$  se encontró aumentada únicamente en el grupo de animales tratados con p31-43 (1 µg/ratón). Sin embargo, la expresión de CXCL10 no fue significativa luego de 4 horas post estímulo. En cuanto a IFN $\gamma$  se pudo observar una tendencia al aumento que no llegó a ser significativa.

Decidimos repetir el ensayo anterior evaluando concentraciones 10 veces mayores (10 µg/ratón) de los péptidos de síntesis. En este caso se observó que solo p31-43 fue capaz de inducir la expresión de los mediadores proinflamatorios IFN $\gamma$  e IFN $\beta$  y de forma similar al ensayo anterior, no se observaron cambios en la expresión de CXCL10 (Figuras 9 B). En conjunto, estos resultados son muy relevantes en el contexto de nuestro modelo de enteropatía, ya que permiten demostrar que los efectos biológicos de p31-43 observados *in vivo* son dependientes de su secuencia de P31-43 y no simplemente de la combinación de aminoácidos.

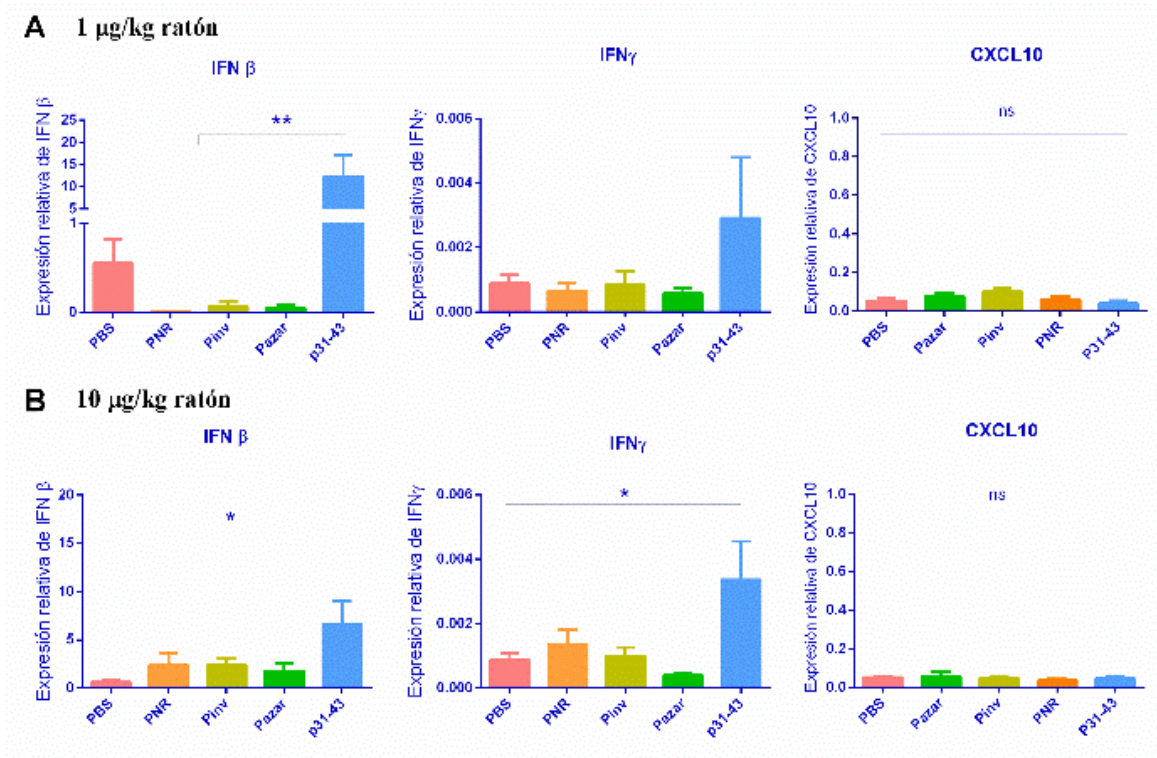


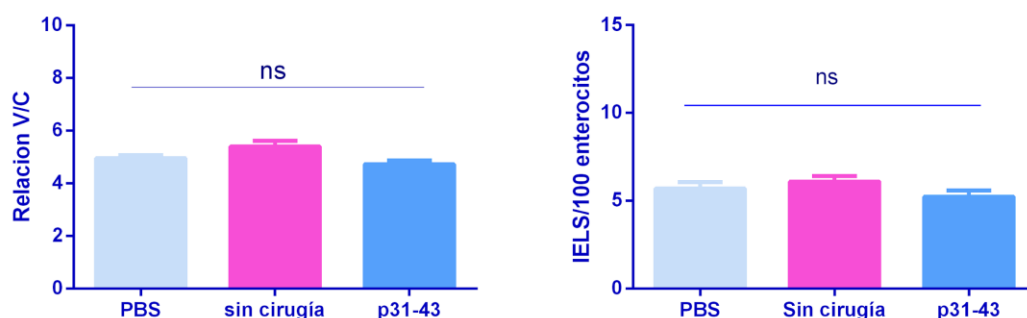
FIGURA 9. EL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 INDUCE LA EXPRESIÓN SECUENCIA-ESPECÍFICA DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATONES C57BL/6

Expresión de mRNA de mediadores proinflamatorios IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  y CXCL10 a 4 horas post-estímulo en ratones tratados por vía intraluminal con soluciones de péptidos a una dosis de **A.**- 10 µg/Ratón y **B.**- 1 µg/Ratón. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo. Estadístico: Test de ANOVA. \*\*  $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$

#### 4.1.1.2.3. Implicancia de los receptores de interferones tipo I en la generación de enteropatía inducida por p31-43

En estudios previos en nuestro laboratorio, buscamos investigar los mecanismos de señalización involucrados en la mediación de los efectos inducidos por p31-43. Para esto comenzamos con la evaluación de la vía MyD88, central a la respuesta inmune innata. Empleando ratones MyD88<sup>-/-</sup> no observamos inducción de daño por p31-43, pero si en animales de la cepa C3H-HeJ, deficientes en la vía de señal de TLR4. Estos resultados nos permitieron concluir que los mecanismos de daño inducidos por p31-43 son dependientes de MyD88 pero no de TLR4 (Araya et al. 2016).

10µg/ratón



1 µg/ratón

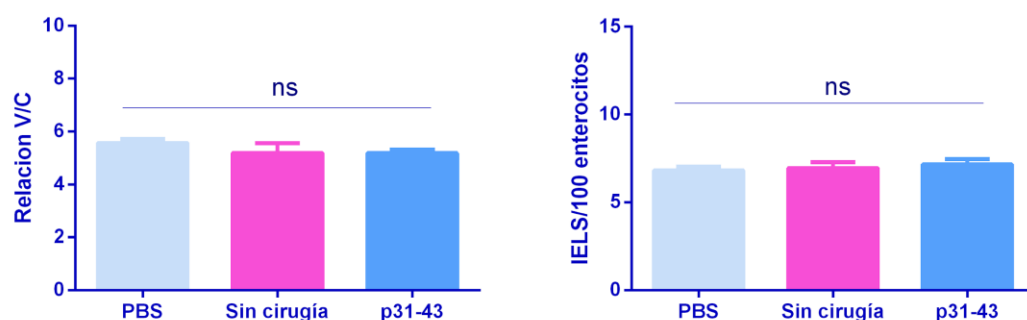


FIGURA 10. LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS INDUCIDOS POR P31-43 SON DEPENDIENTES DE IFN TIPO I

Se utilizaron ratones KO para el receptor de IFN $\alpha$  inoculados intraluminalmente con p31-43 o PBS y se reservó un grupo sin cirugía como control. Se realizó un análisis morfológico evaluando la relación V/C y recuento de IELs. **A.-** Resultados con p31-43 a 10 µg/ratón **B.-** Resultados con p31-43 a 1µg/ratón. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo. Estadístico: test ANOVA.

Por otro lado, el análisis de varias citoquinas proinflamatorias mostró que p31-43 induce un incremento de la expresión de IFN $\beta$ . Es por esto que para evaluar *in vivo* las implicancias de esta vía en la enteropatía inducida por p31-43, se utilizaron ratones Knock-Out para el receptor de INF $\alpha$  (IFN $\alpha$ R $^{-/-}$ ). Siguiendo el protocolo descrito previamente (Figura 5), se administró intraluminalmente p31-43 o PBS, y se tomaron muestras de intestino proximal 16 h post inoculación. Se empleó un grupo de ratones sin cirugía, como control. Observamos que los ratones IFN $\alpha$ R $^{-/-}$  tratados con p31-43 no desarrollaron enteropatía con ninguna de las dosis evaluadas, 1  $\mu$ g/ratón o 10  $\mu$ g/ratón (Figura 10). Estos resultados muestran que los mecanismos de daño inducidos por p31-43 requieren elementos de la vía de IFNs tipo I.

#### *4.1.2. Estudios realizados en un modelo murino de enteropatía con administración intragástrica de p31-43*

El modelo de enteropatía que emplea inoculación intraluminal mediante microcirugía se eligió en función de evitar complejidades en la interpretación de los resultados debido a efectos de la degradación del péptido a lo largo del tracto gastrointestinal. Este modelo fue funcional para evaluar los mecanismos de daño inducidos por p31-43, así como para realizar la comparación con péptidos controles. Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas desde el punto de vista operativo, como el tiempo requerido para realizar cada intervención quirúrgica por animal (aproximadamente 15 a 20 minutos) y complicaciones propias de un procedimiento quirúrgico, como hipotermia, pérdida de fluidos o depresión cardio-respiratoria debido a la utilización de isoflurano como anestésico (Flecknell 2015). Esto puede afectar negativamente la sobrevivencia de los animales durante la cirugía y requiere un atento monitoreo por parte del operador. Finalmente, dado que el procedimiento quirúrgico

requiere el ingreso a la cavidad abdominal y la manipulación del intestino durante la inoculación del estímulo, se podrían generar artefactos en nuestros análisis. Aunque en estudios previos se incluyeron diferentes controles como la inoculación de PBS (vehículo), y de un péptido no relacionado, decidimos evaluar la vía intragástrica como forma de administración. En particular, este cambio de procedimiento obedece a consideraciones del bienestar animal, ya que aun habiendo introducido la anestesia inhalatoria y refinado los procedimientos de cuidado animal, es innegable que la cirugía es un procedimiento invasivo.

La administración intragástrica es una técnica económica, segura y, si es realizada de manera correcta, es indolora para el animal, además sólo requiere un buen manejo técnico por parte del operador (Turner et al. 2011). Entre sus ventajas se encuentra el

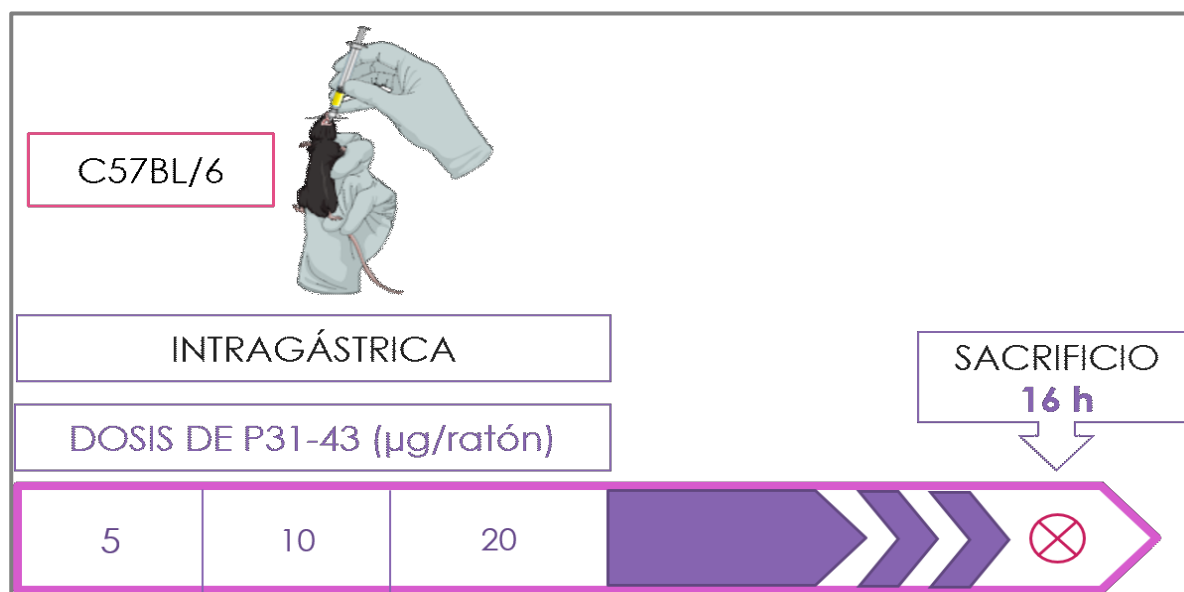


FIGURA 11. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRAGÁSTRICA CON DIFERENTES DOSIS DE P31-43 EN RATONES C57BL/6

Se utilizaron ratones macho de 7-8 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Se administraron 200 µl de solución del péptido p31-43 por vía intragástrica, se evaluaron tres dosis de péptido, 5, 10 y 20 µg/ratón o PBS como control de vehículo. Luego de 16 horas se procedió al sacrificio de todos los grupos de animales y se colectaron los intestinos delgados para análisis morfométrico (relación V/C y recuento de IELs), de modo de seleccionar la dosis adecuada a la que se induce enteropatía en el modelo murino.

hecho de que se pueden administrar volúmenes mayores (Hedrich y Bullock 2004) y que no requiere el uso de un equipamiento complejo.

En esta sección se utilizó el diseño experimental esquematizado en la Figura 11. Para seleccionar la correcta dosis de trabajo en este nuevo modelo de administración intragástrica, evaluamos diferentes dosis de estímulo con p31-43 (5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) o PBS. Luego de 16 horas, se procedió al sacrificio y se colectaron los intestinos delgados para realizar análisis morfométricos en secciones teñidas con H&E.

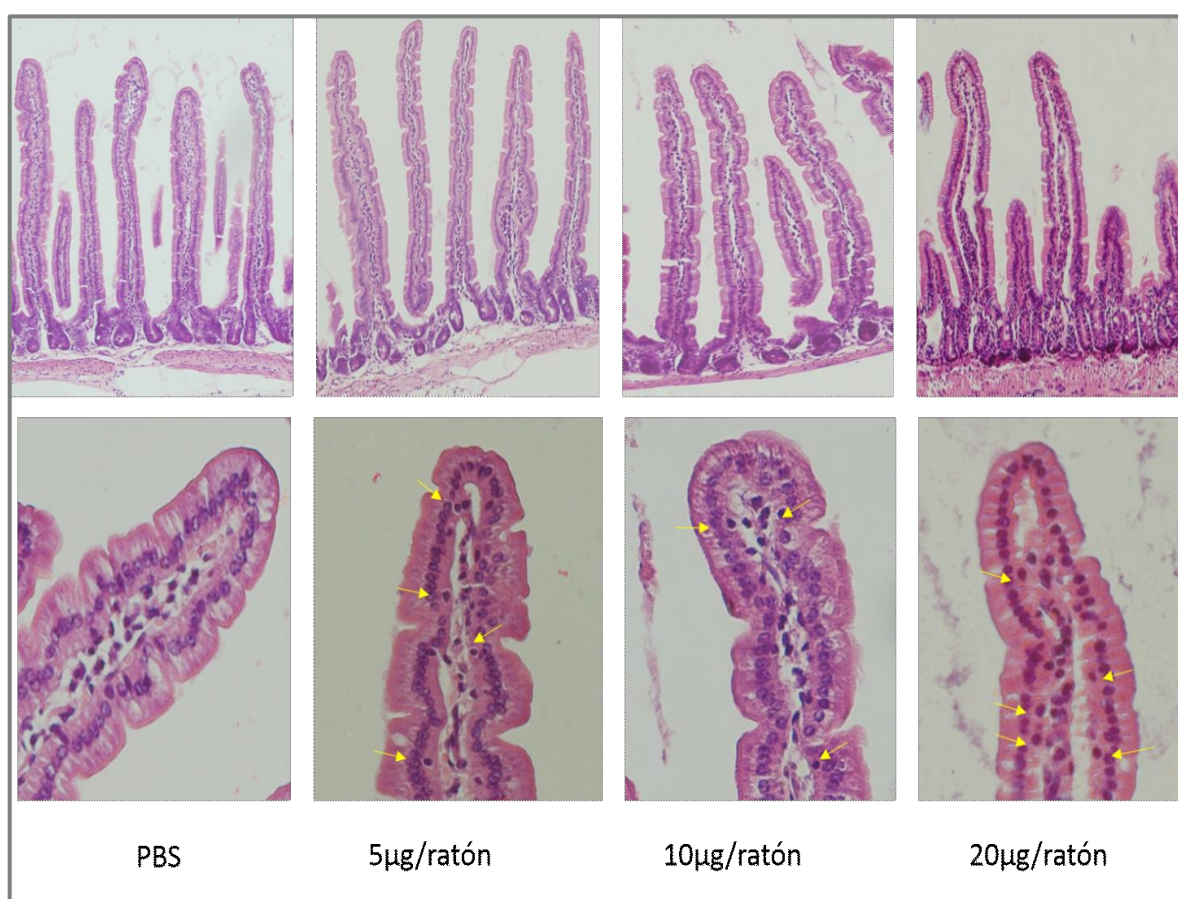


FIGURA 12. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE INTESTINO DELGADO A LAS DOSIS DE p31-43 ADMINISTRADAS INTRAGÁSTRICAMENTE

En los paneles se presentan imágenes representativas de la histología realizada sobre secciones teñidas con H&E a diferentes dosis de p31-43 que posteriormente se utilizaron para realizar el análisis morfométrico. **Panel superior:** imágenes a 20X de vellosidades y criptas. **Panel inferior:** Imágenes a 40X de puntas de vellosidades. Las flechas amarillas indican IELs presentes en el tejido.

En la figura 12, se pueden observar imágenes representativas de la histología obtenida a las dosis de p31-43 utilizadas. Se realizaron mediciones de relación V/C de aproximadamente 20 vellosidades por ratón y el recuento de IELs/100 enterocitos en 10 puntas de vellosidades elegidas al azar por cada ratón.

En la Figura13 A se puede observar que para lograr un descenso significativo en la relación V/C con respecto al control de PBS, fue necesaria una dosis de 20  $\mu$ g de p31-43.

Por otro lado, en cuanto al número de IELs, se encontraron valores significativamente aumentados a las tres concentraciones de péptido evaluadas (Figura 13 B). Es de destacar que el aumento del número de IELs, pareciera ser uno de los indicadores más sensibles al daño inducido por p31-43, ya que se requieren menores dosis de p31-43 para observar un aumento. Además, es interesante notar que el incremento en el número de IELs observado por la administración intragástrica de p31-

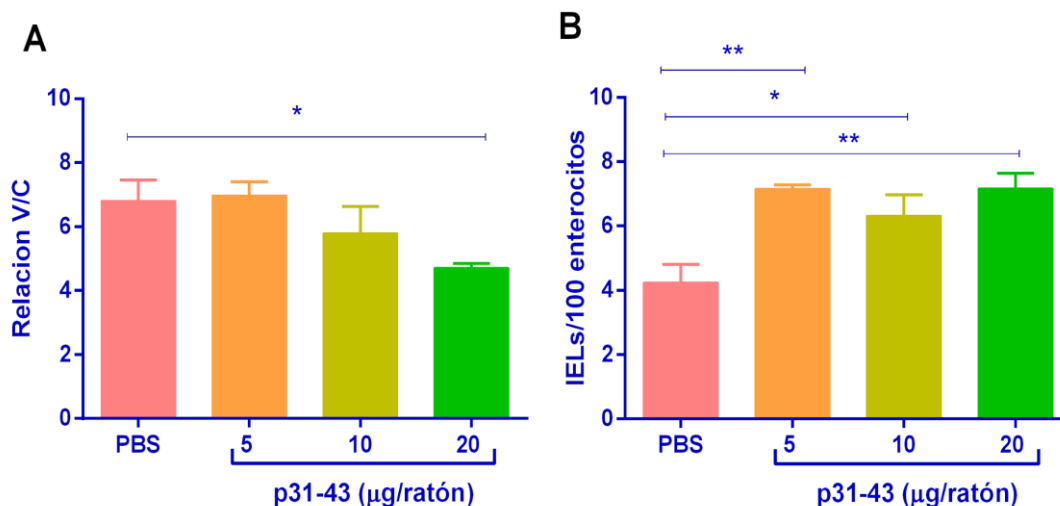


FIGURA 13. EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAGÁSTRICA DE P31-43

A ratones C57BL/6 machos de 7-8 semanas de edad se le administró por vía intragástrica diferentes dosis de p31-43, 5,10 y 20 $\mu$ g/ratón respectivamente o PBS. Luego de 16h post administración, se procedió al sacrificio y se colectó el intestino delgado para su posterior análisis por histología sobre secciones teñidas con H&E. **A.-** Relación V/C. **B.-** Número de IELs. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo. Test ANOVA \*\* p < 0,01; \*p < 0,05.

43, es menor que el observado en el modelo utilizando microcirugía e inoculación intraluminal.

Este modelo de inoculación intragástrica resultó válido para la inducción de enteropatía murina en ratones C57BL/6 ya que los resultados obtenidos fueron consistentes con nuestro modelo previo de enteropatía inducida por inoculación intraluminal de p31-43. En base al análisis morfométrico se decidió continuar trabajando a 20 µg/ratón, ya que consideramos que esta concentración es la óptima.

Luego, nos interesó evaluar si el daño producido por el péptido era transitorio y de ser así, en que tiempo se recuperaba la histología intestinal normal. Para esto se administró por vía intragástrica 20 µg/ratón de p31-43 y se evaluaron parámetros morfométricos luego de 4h, 16h, 48h, 72 h y 1 semana de estimulación (Figura 14).

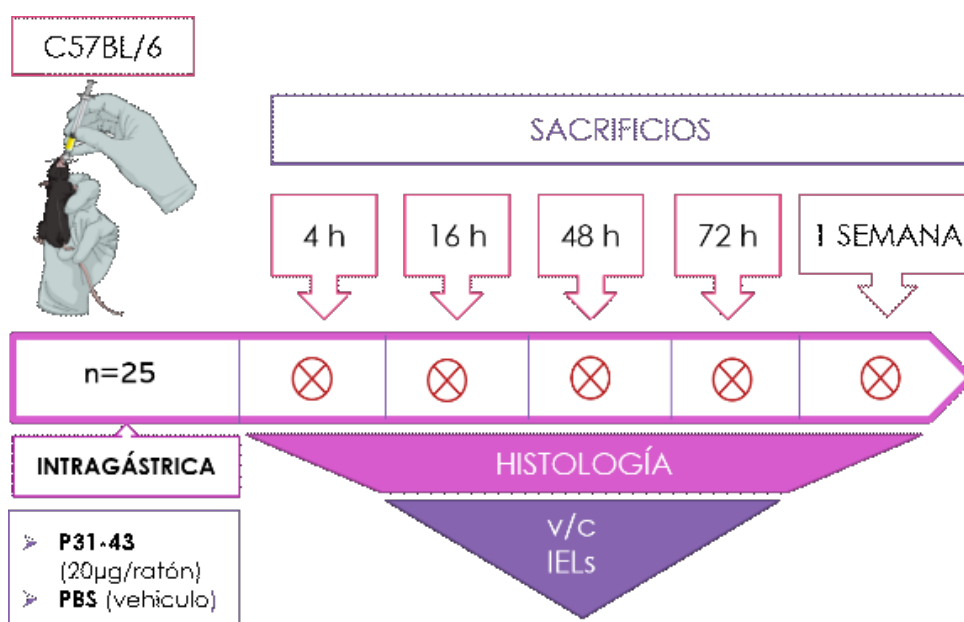


FIGURA 14. DISEÑO EXPERIMENTAL DE CINÉTICA CON P31-43

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad, 5 animales por grupo, a los que se les administró por vía intragástrica p31-43 a 20µg/ratón o PBS, esta administración fue considerada como el tiempo 0. Luego de 4, 16, 24, 48, 72 horas y 1 semana post administración se sacrificaron los animales y se tomaron muestras de intestino delgado para realizar la evaluación histológica correspondiente sobre secciones teñidas con H&E.



En la figura 15 A, podemos observar que el tratamiento con p31-43 sólo indujo un descenso significativo de la relación V/C luego de 16 horas post administración intragástrica. Si bien a las 4 horas se observó que la relación V/C comenzó a disminuir, esto no fue significativo. Los valores de V/C se recuperan al nivel basal comparable con PBS, manteniéndose estables desde las 48 horas hasta la semana post administración.

Podemos concluir que p31-43 induce daño histológico transitorio que se hace estadísticamente evidente a las 16 horas, recuperándose la arquitectura intestinal normal luego de 48 horas post estimulación. En cambio, el reclutamiento de IELs es más rápido (Figura 15 B), ya que aumentan de manera significativa a las 4 horas y este aumento se mantiene estable hasta las 72 horas.

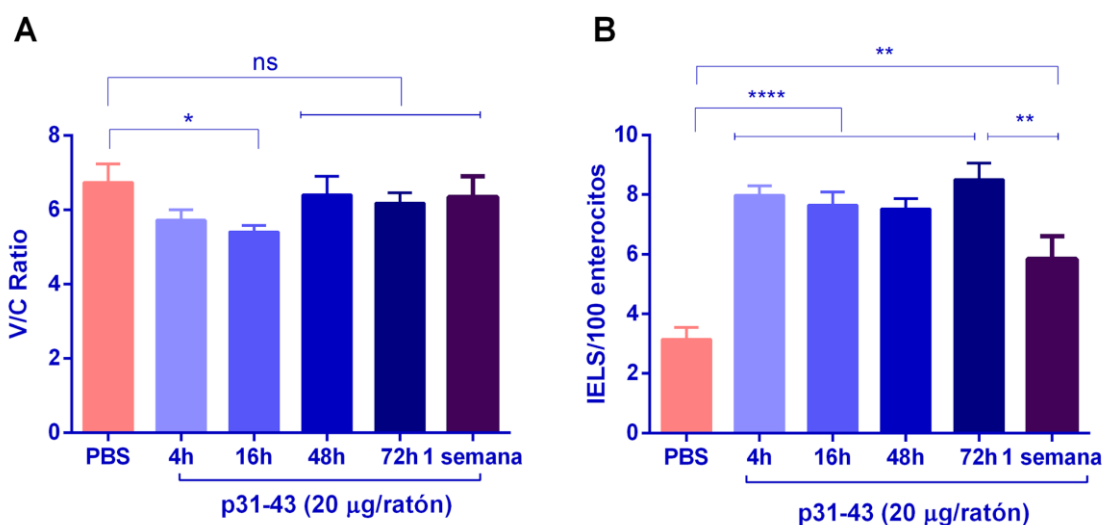


FIGURA 15. EVALUACIÓN CINÉTICA DE DAÑO CON P31-43

A ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad se les administró por vía intragástrica de 20 µg de p31-43 o PBS (vehículo). A las 4h, 16h, 24h, 48h, 72h y 1 semana post administración, se procedió al sacrificio y se colectaron los intestinos delgados para su posterior análisis por histología sobre secciones teñidas con H&E. **A.-** Relación V/C. **B.-** Recuento de IELs. Se utilizaron 5 ratones por grupo. Se utilizó un test estadístico ANOVA \*\*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ . Además de un test posterior de Bonferroni.

Sin embargo, luego de una semana se observa un descenso significativo de IELs, pero su valor continúa siendo significativamente mayor al nivel basal de IELs del grupo tratado con PBS. En conclusión, pudimos confirmar que el reclutamiento de IELs es un proceso más rápido y sensible que la remodelación tisular. Finalmente, se eligió continuar realizando los análisis morfométricos a las 16 horas post administración oral de p31-43 a una dosis de 20 µg/ratón.

## 4.2. Sección II: Evaluación de efectos inducidos por la administración intragástrica de p31-43 en ratones NOD-DQ8

*La presente sección se realizó en colaboración con la Dra. Elena Verdú en Farcombe Institute, Mc.Master University, Hamilton, Canadá*

En la sección previa hemos demostrado que la administración de p31-43 induce cambios tempranos en la mucosa de intestino delgado proximal. En esta sección nos preguntamos si la alteración en la mucosa intestinal puede tener efectos a largo plazo sobre la inducción de la respuesta inmune.

Para esto, realicé una visita al laboratorio de la Dra. Elena Verdú con el fin de desarrollar nuestro modelo de enteropatía empleando ratones de la cepa NOD-DQ8. Estos ratones tienen un background genético que predispone a autoinmunidad y expresan la molécula de MHC humano HLA-DQ8 (que como mencionamos es un alelo capaz de presentar péptidos derivados de gluten y fuertemente asociado a EC). La Dra. Verdú, en colaboración con nuestro grupo realizó estudios en ratones NOD-DQ8 y observó que la depleción parcial de células T regulatorias (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>) con un anticuerpo anti-CD25 durante 2 semanas, seguida de la administración de toxina colérica y gliadina (digerida con pepsina y tripsina) por tres semanas, produjo un aumento moderado en el número de IELs, una disminución en la relación de V/C, además de alteraciones en la función de barrera epitelial intestinal (Galipeau et al. 2011). Es de destacar que el bioterio en la Universidad Mc Master (CAF) está acondicionado para realizar investigaciones sobre microbiota intestinal, utilizando animales libres de gérmenes (GF). Es decir, que posee numerosas barreras sanitarias, tanto de inclusión para prevenir el escape de

enfermedades desde el interior de las salas de animales al exterior, como de exclusión que evitan la entrada de cualquier microorganismo del exterior que pudiera provocar infecciones en los animales, o para simplemente cambiar la composición de su microbiota ya definida.

Los animales SPF convencionales con los que trabajé, se encontraban en salas con menores barreras de exclusión, pero que para ingresar a ellas se requirió capacitación y acreditación de acceso. Los animales se encontraban en una habitación con antesala como barrera que contaba con materiales de protección primaria, como camisolín, cubrepies, cofia, barbijo autoclavados, y guantes. La habitación poseía aire filtrado con filtros HEPA y diferencia de presión con el exterior para evitar el ingreso de aire desde la antesala. Los animales se ubicaron en racks y cada cepa poseía ratones centinelas con los que se monitoreó la presencia de infecciones. Finalmente, dentro de la sala se encontraba una cabina de seguridad biológica tipo, 2 en la que se realizaron todos los procedimientos descritos a continuación. A su vez, en esas instalaciones contaban con un control de la dieta muy estricto, los animales reciben alimento estéril con un porcentaje de grasa definido. Todas estas características resultaron esenciales para realizar evaluaciones a largo plazo del impacto de la alteración en la mucosa intestinal, inducido por p31-43.

#### *4.2.1. Efectos inducidos por la administración de p31-43 en ratones NOD-DQ8*

Dado que se trabajará con animales de otra cepa y en particular pertenecientes a un bioterio diferente, que se caracteriza por el estrecho control de los microorganismos que colonizan a los ratones, decidimos en primer lugar realizar una evaluación de la respuesta de estos animales ante la administración intragástrica de p31-43. Se procedió

a administrar por vía oral 20 µg/ratón a ratones NOD-DQ8 de 8 semanas. A las 16h se los sacrificó y se colectó el intestino delgado para realizar estudios de histología (Figura 16).

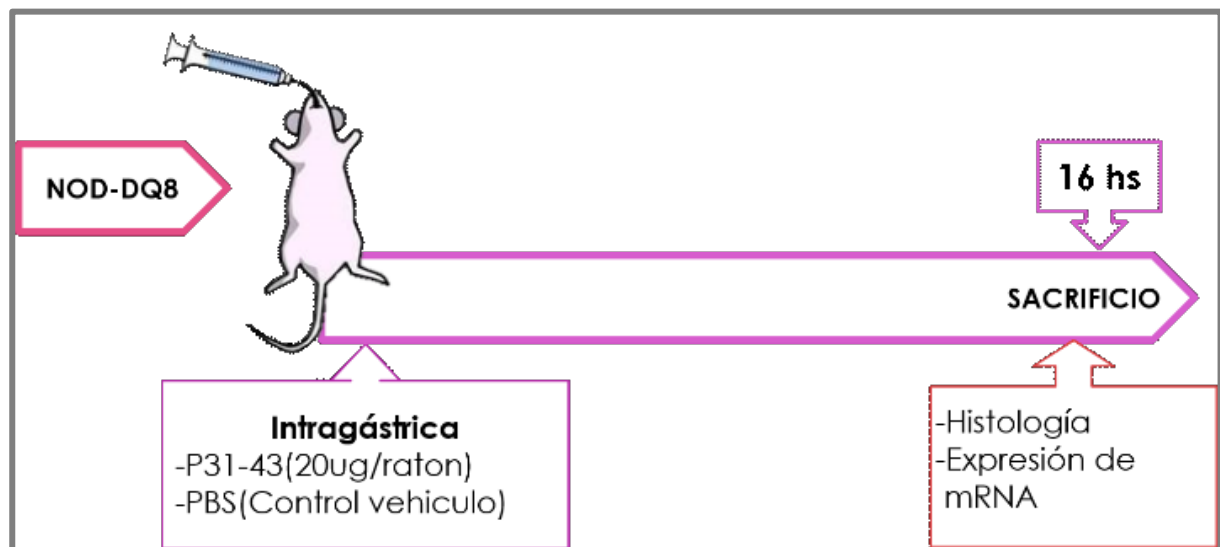


FIGURA 16. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRAGÁSTRICA DE P31-43 DE RATONES NOD-DQ8

Se utilizaron ratones NOD-DQ8 hembras de 8 semanas de edad, 5 animales por grupo. Los mismos se encontraban en una dieta libre de gluten previo al tratamiento. Estos animales recibieron una inoculación intragástrica, con sondas plásticas descartables, de péptido p31-43 (20 µg/ratón) o PBS. Luego de 16h post inoculación se sacrificaron los animales y se tomaron muestras de intestino delgado, 2 cm por debajo del estómago, en la región del duodeno y se colocaron en formol (4 %v/v), para su posterior análisis histológico.

El análisis morfométrico mostró un marcado aumento en el número de IELs, sin cambios significativos en la relación V/C (Figura 17). Como mencionamos anteriormente la variación del número de IELs resultó ser un marcador más sensible en la respuesta frente al tratamiento con p31-43.

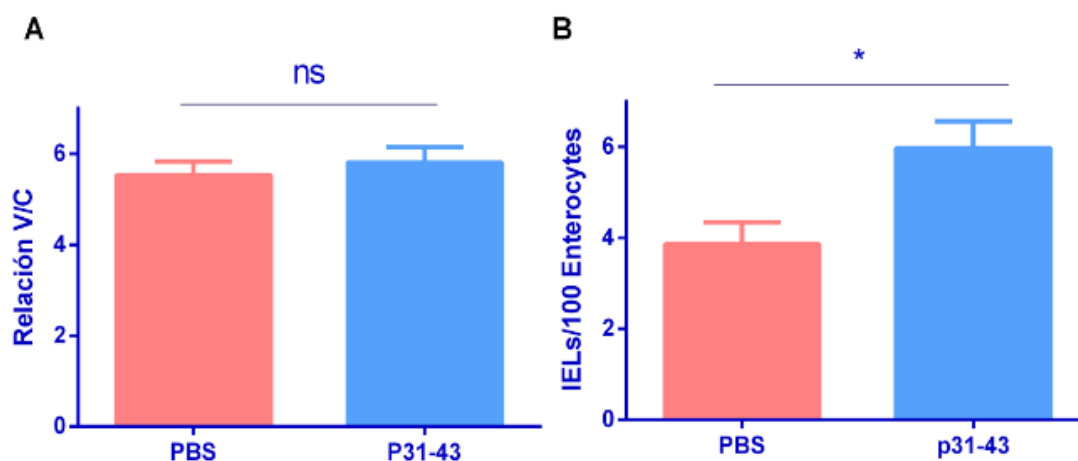


FIGURA 17. EN RATONES NOD-DQ8, P31-43 INDUCE AUMENTO DEN EL NÚMERO DE IELs SIN DISMINUCIÓN SIGNIFICATIVA EN LA RELACIÓN V/C

Ratones NOD-DQ8 fueron tratados por vía intragástrica con PBS o p31-43 (20 µg/ratón). 16h post-tratamiento se colectaron los intestinos delgados y se realizó el análisis histológico sobre secciones teñidas con H&E. **A.**- Relación V/C y **B.**- número de IELs. N=5. Análisis estadístico: Test-t Student. \* p<0,05.

#### 4.2.2. Expresión de mediadores proinflamatorios inducidos por p31-43 en ratones NOD-DQ8

Para caracterizar la respuesta frente al tratamiento por vía intragástrica con p31-43 en ratones NOD-DQ8, también se analizó el nivel de expresión de RNA mensajero de mediadores proinflamatorios previamente caracterizados en el modelo experimental murino, como IFN $\beta$  y CXCL10 a las 4 horas post inoculación. No obstante, en este caso se analizó además IL-1  $\alpha$ , pero luego de 16h post tratamiento (Figura 18). Se observó un incremento en los niveles de IFN $\beta$  con una media 15 veces mayor comparados a animales tratados del grupo control.

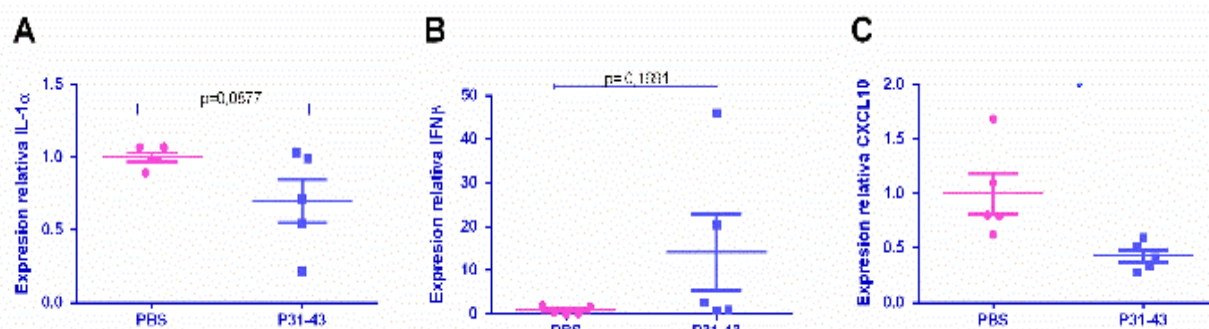


FIGURA 18. NIVELES DE RNA MENSAJERO EN MUESTRAS DE INTESTINO DELGADO PROXIMAL DE RATONES NOD-DQ8 TRATADOS CON P31-43

Ratones NOD-DQ8 fueron tratados por vía intragástrica con PBS o p31-43, 20  $\mu$ g/ratón. 16h post-tratamiento se colectaron los intestinos delgados y se realizó el análisis por qPCR de los niveles de RNAm de A.- IL-1 $\alpha$  B.- IFN $\beta$  y C.- CXCL10. Se graficó la expresión relativa de CXCL10, IFN  $\beta$  e IL-1 $\alpha$  analizada con el método  $\Delta\Delta$ CT. Se utilizó HPRT como gen de referencia y todos los valores se normalizaron con el control de PBS. Se analizó estadísticamente utilizando un Test T-Student \*  $p < 0,05$ .

En cambio, para IL-1 $\alpha$  y CXCL10, se evidenció una disminución significativa. Es de destacar que estos mediadores son muy tempranos y que, por ejemplo, en estudios previos se describió que el pico de RNAm de CXCL10 se produce a las 4-6 horas post tratamiento con p31-43, normalizándose completamente a las 12h (Araya et al. 2016). En nuestro caso, no se pudo realizar la medida de expresión luego de 4 horas de tratamiento, debido a limitaciones en el uso de animales NOD-DQ8.

Es de considerar, que los ratones de esta cepa no respondan de la misma forma que los animales de las otras cepas evaluadas (C57BL/6 o BALB/c), o bien que las características de la microbiota puedan influir. Este último aspecto es sumamente interesante y será discutido más adelante. Por lo tanto, si bien no se observó un cambio en la relación V/C como se esperaba, decidimos mantener el mismo protocolo de administración de p31-43 para los ensayos siguientes.

### 4.2.3. Efectos de la administración de p31-43 y posteriores desafíos con gluten en ratones NOD-DQ8

En esta sección evaluamos si el daño transitorio producido por p31-43 puede tener consecuencias evidenciables a largo plazo, promoviendo la inducción de una respuesta adaptativa. El diseño experimental propuesto en este caso se ilustra en la figura 19 y consistió en inducir alteración de la mucosa intestinal mediante una única administración de p31-43 (20µg/ratón) y luego de 16 horas, comenzar con la administración de gluten (3 veces por semana) durante cuatro semanas.

En la Figura 20, se muestra que la relación V/C y el número de IELs no presentaron diferencias entre los animales pretratados con p31-43 comparado con PBS. En el caso de

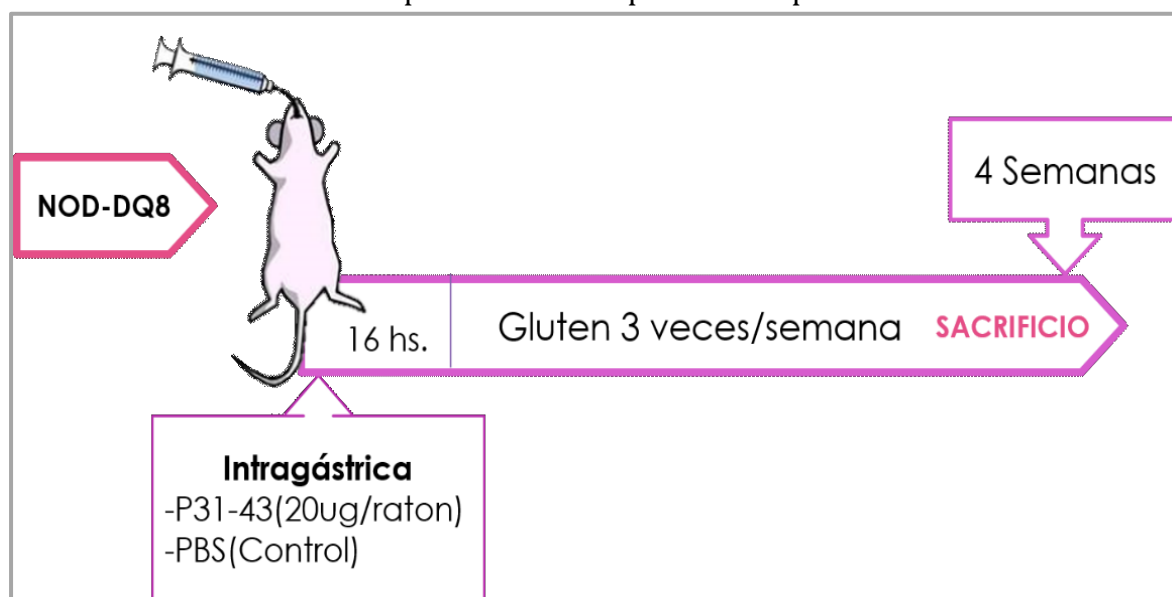


FIGURA 19. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE INOCULACIÓN INTRAGÁSTRICA DE P31-43 DE RATONES NOD-DQ8

Se utilizaron ratones NOD-DQ8 hembras de 8 semanas de edad, 8 animales por grupo. Los mismos se encontraban en una dieta libre de gluten y baja en grasa (4%p/p) previo al tratamiento. Estos animales recibieron una inoculación intragástrica de péptido p31-43 (20 µg/ratón) o PBS, luego de 16h post administración oral, se iniciaron los desafíos con una solución de gluten (Sigma) 3 veces por semana, por un periodo total de 4 semanas, con 200 µL de solución conteniendo 2 mg gluten/ratón, diluido en ácido acético (0,02 M). Luego de completar 4 semanas de desafíos orales se realizó el sacrificio de los animales y se tomaron muestras de bazo para el ensayo de proliferación; de duodeno proximal, para histología y para el ensayo de permeabilidad con "ussing chambers"



la relación V/C, los valores obtenidos son similares a resultados previos obtenidos utilizando animales NOD-DQ8 en dieta libre de gluten, no tratados con el péptido p31-43 (Araya 2015).

#### 4.2.4. Análisis de permeabilidad en intestino delgado de animales NOD-DQ8 luego de tratamiento con p31-43 y posteriores desafíos con gluten

Resultados previos utilizando animales NOD-DQ8 pretratados con p31-43, pero utilizando administración intraluminal mediante microcirugía, mostraron cambios en la permeabilidad intestinal luego de dos semanas de administración de gluten en la dieta (Araya 2015). Nos interesó evaluar la permeabilidad intestinal empleando la administración intragástrica de p31-43 y extendiendo el período de desafíos con gluten a cuatro semanas.

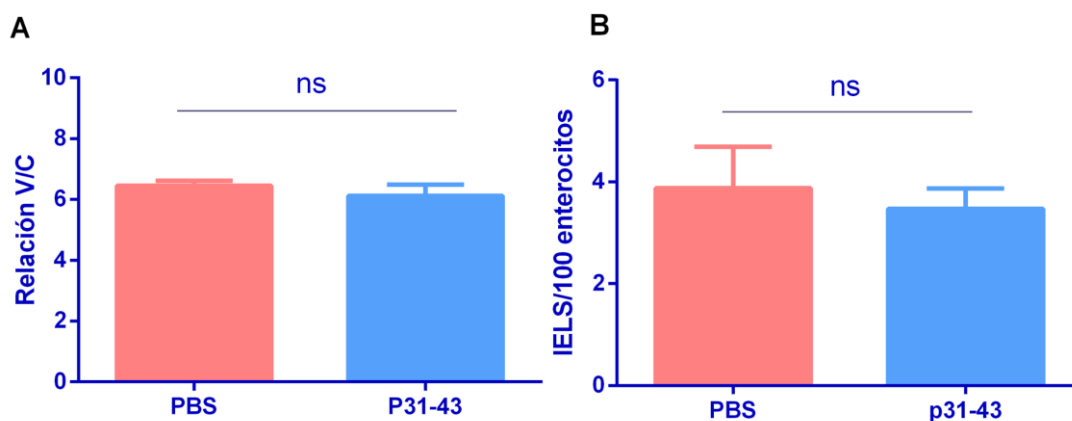


FIGURA 20. ANÁLISIS DE LA HISTOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO DE ANIMALES NOD-DQ8 LUEGO DE 4 SEMANAS DE TRATAMIENTO

Ratones NOD-DQ8 mantenidos en dieta libre de gluten de 8 semanas fueron tratados por vía intragástrica con PBS o p31-43 (20 µg/ratón). 16 horas después comenzaron a recibir 2 mg gluten/ratón tres veces por semana. Cuatro semanas después se sacrificaron y se analizó la histología en segmentos de intestino delgado proximal en secciones teñidas con H&E. **A.-** Relación V/C, **B.-** número de IELs. Se utilizaron 8 ratones hembra por grupo y se realizó un análisis estadístico test t-Student.

Para evaluar parámetros funcionales se empleó la técnica de “Ussing chamber” (Galipeau et al. 2011; de Kauwe et al. 2009; Verdu, Armstrong, y Murray 2009, 200). Para esto se tomó una sección de intestino delgado de aproximadamente 1,5 cm de largo de la región del duodeno, se cortó longitudinalmente y se obtuvo una lámina plana que se colocó en un soporte acrílico que expuso un área de 0.7 cm<sup>2</sup> de tejido a 8 mL de buffer Krebs aireado con 95 % (v/v) de O<sub>2</sub> y 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> (pH= 7,3- 7,4). La sección plana de tejido tomó contacto, en su lado basal con un buffer con 10 mM de glucosa y en su lado luminal con un buffer con 10 mM de Manitol. El sistema se mantuvo a una temperatura constante de 37 °C. Se utilizaron electrodos para medir la diferencia de potencial de la membrana y para determinar la corriente transepitelial o corriente de cortocircuito (I<sub>sc</sub>). La misma refleja el transporte activo de iones que ocurre en la membrana. A partir de este valor se puede calcular la resistencia eléctrica transepitelial (R<sub>te</sub>), la cual refleja la integridad del tejido en relación con la permeabilidad paracelular. Por otro lado, la conductancia transepitelial (G<sub>Te</sub>) nos permite obtener información acerca del transporte pasivo de iones. Para el estudio del flujo de solutos o flujo isotópico a través del tejido, se utilizó un radioisótopo marcado denominado <sup>51</sup>Cr-EDTA (1 μCi), el mismo no es metabolizado y es ampliamente utilizado tanto en animales como humanos, para el estudio cuantitativo del transporte paracelular a través del epitelio intestinal (H. et al. 2003; Hug 2011). En nuestro sistema la sonda se agregó al compartimiento del lado basolateral de la mucosa y se tomaron muestras del lado luminal cada 30 minutos, durante 4 horas. Posteriormente, se midió la radioactividad en un contador de centelleo y se expresó como el porcentaje recuperado, sobre el total administrado.

El análisis de los segmentos de intestino de los animales tratados con PBS o p31-43 y desafiados con gluten durante cuatro semanas no mostró diferencias en los parámetros de permeabilidad estudiados (Figura 21).

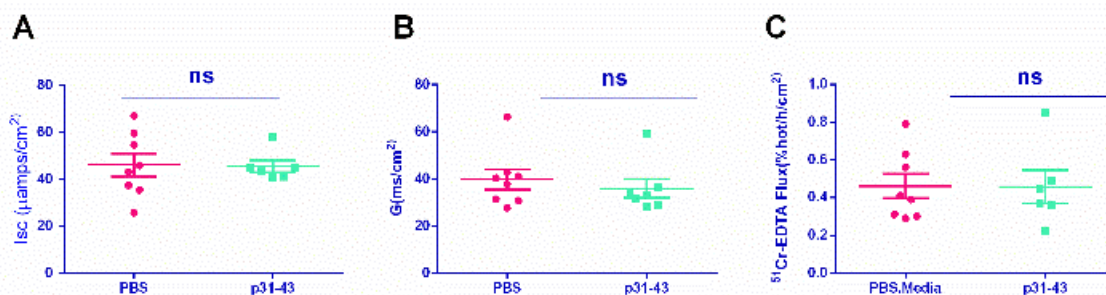


FIGURA 21. EL PRETRATAMIENTO CON P31-43 NO INDUCE CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD INTESTINAL

Ratones NOD-DQ8 mantenidos en dieta libre de gluten, fueron tratados por vía intragástrica con PBS o p31-43 (20  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ). 16 h después se comenzó la administración de gluten (2 mg/ratón) tres veces por semana. Cuatro semanas después se procedió al sacrificio y la recolección de los intestinos delgados. Segmentos de intestino delgado proximal fueron colocados en el equipo "Ussing Chamber" para la evaluación de **A.-** la corriente transepitelial en condiciones de corto circuito y voltaje constante, que se expresa como Isc ( $\mu\text{Amp. Seg}/\text{cm}^2$ ), **B.-** La conductancia transepitelial (Gt) expresada en ( $\text{mS}/\text{cm}^2$ ) y **C.-** el flujo del radio isótopo marcado  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . El mismo se agregó en el lado basolateral de la membrana y se tomaron muestras cada 30 minutos, durante 4 horas, del compartimiento de cara al lado apical del tejido. Se midieron las muestras utilizando un contador de centelleo y se expresaron los datos como flujo isotópico de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  ( $\% \text{ hot}/\text{h}/\text{cm}^2$ ). Se utilizaron 7-8 ratones por grupo. El análisis estadístico se realizó con test T-student.

#### 4.2.5. Análisis de proliferación de células de bazo específicas de gliadinas luego de tratamiento con p31-43 y posteriores desafíos con gluten

Como mencionamos, resultados previos (Araya 2015) demostraron que p31-43 era capaz de exacerbar la respuesta subsecuente a gluten luego de 2 semanas de desafío con gluten. Se observó reducción en la relación V/C, aumento en el número de IELs, así

como también aumento en la permeabilidad transcelular. Estos estudios se llevaron a cabo mediante inoculación intraluminal del péptido mediante microcirugía.

En la presente sección, el objetivo fue evidenciar si el desafío con gluten posterior a la inducción de daño en la mucosa intestinal utilizando el péptido p31-43, podría inducir una respuesta antígeno específica. Con respecto al estudio anterior, se introdujeron cambios en el diseño experimental. Por un lado, la administración intragástrica reduce los efectos inflamatorios que pudieran ser inducidos por la administración intraluminal durante la microcirugía. Además, se extendió el estudio a cuatro semanas (Figura 19).

Nuestro plan de trabajo proponía la evaluación de la respuesta antígeno-específica, mediante un ensayo de proliferación *in vitro* de células obtenidas de ganglios mesentéricos. Sin embargo, como no pudo obtenerse un número suficiente de células para realizar todos los ensayos y sus controles, se recurrió a células de bazo.

Para esto se utilizaron animales pretratados con p31-43 o PBS por 16 horas y se mantuvieron en dieta baja en grasas y libre de gluten. Estos animales fueron desafiados con gluten (2 mg/ratón) tres veces por semana, durante cuatro semanas. Luego, se extrajeron los bazos en condiciones de esterilidad y se obtuvieron esplenocitos aislados, que fueron re estimulados *in vitro* con gliadina digerida con pepsina y tripsina (PT-Gliadina 0,5mg/mL) durante 4 días. Luego, se analizó por citometría de flujo y marcación con CFSE la proporción proliferante de células vivas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Se utilizaron dos controles positivos de proliferación uno con CD3 y CD28 unidos a la placa; y otro con CD3 unido a la placa pero CD28 en solución. En la figura 22A, se muestra la estrategia de análisis de los datos de citometría, obtenidos de un control positivo de proliferación, mostrando la forma en que se realizó todo el análisis de los datos del experimento.

Es interesante observar (Figura 22 B) que luego de que ambos grupos de ratones recibieron el desafío con gluten durante 4 semanas, solo el grupo que recibió el

pretratamiento con p31-43 por 16 horas, presentó una mayor proporción de células vivas proliferantes comparado con el grupo pretratado con el vehículo (PBS). Es importante remarcar que la proliferación de células de bazo observada no fue específica. Dado que no se observaron diferencias significativas entre las células re estimuladas con PT-Gliadina comparadas a las que se incubaron únicamente con medio de cultivo.

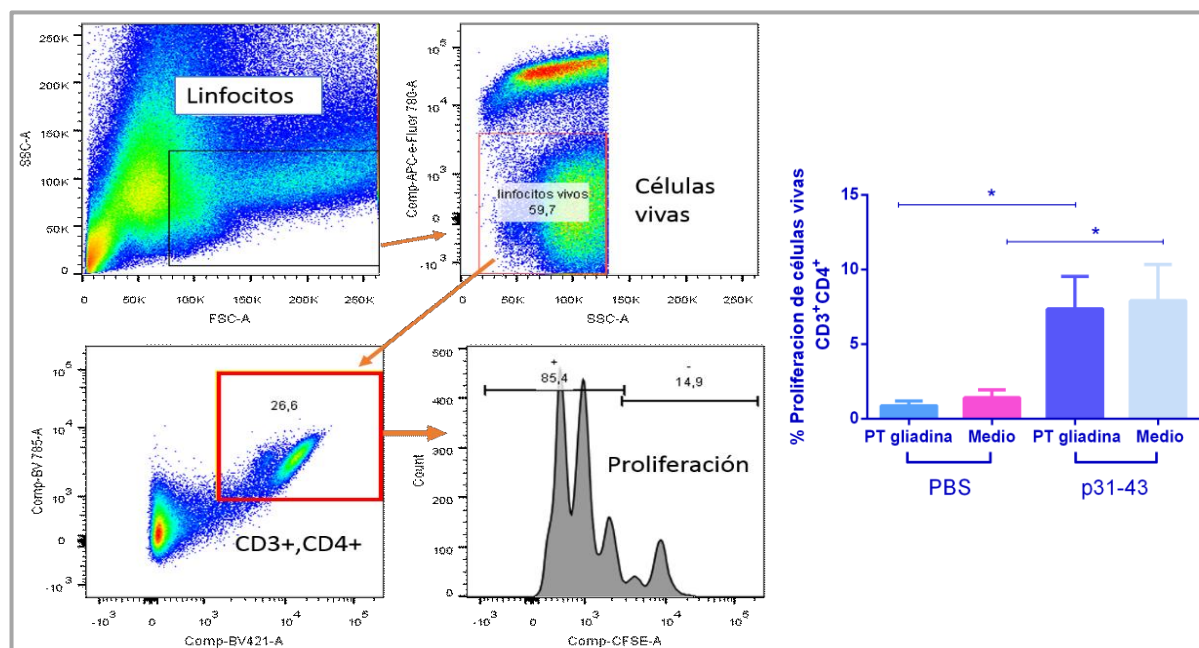


FIGURA 22. EL PRE-TRATAMIENTO CON P31-43 INDUCE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS DE BAZO DE MANERA NO ESPECIFICA PARA PT-GLIADINA

En la figura se presenta (Panel izquierdo) la estrategia de selección aplicada a los datos obtenidos por citometría de flujo en el caso de un control positivo del grupo de animales pretratados con PBS. (Panel derecho) Se observa el porcentaje de proliferación de células de bazo vivas CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> extraídas de ratones NOD-DQ8 (8 animales por grupo) que recibieron un pre-tratamiento con p31-43 por 16 horas y un posterior desafío con gluten durante 4 semanas. Las células extraídas de bazo fueron marcadas con CFSE y desafiadas con PT-gliadina. Luego de 4 días se realizó la marcación con anticuerpos y se seleccionó la población de células de bazo vivas CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>. Se adquirieron los eventos utilizando un citómetro BD LSR II con software Cell Quest. El análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo.10. Estadística: ANOVA. \*p<0,05



## 5. **Discusión**

La toxicidad de los péptidos de gluten radica en la composición y secuencia de los aminoácidos que los componen (Iacomino et al. 2013; Lebreton et al. 2012; Meresse, Malamut, y Cerf-Bensussan 2012). Los péptidos de gluten son difícilmente degradados por enzimas del tracto gastrointestinal debido que poseen secuencias repetitivas con alto contenido en prolina y glutamina, con pocos sitios de corte para las enzimas del tracto digestivo. Se ha descrito que estos péptidos son capaces de inducir una fuerte respuesta adaptativa en EC, así como también respuestas inflamatorias evidenciadas por ensayos *in vitro* (M. Barone, Troncone, y Auricchio 2014). Entre los péptidos más comúnmente asociados a la respuesta adaptativa encontramos al 33-mer, un péptido de  $\alpha$ -gliadina que se une a moléculas de HLA-DQ2 e induce activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Por otro lado, se encuentra el péptido p31-43 cuya característica principal es que no es presentados por moléculas de HLA (Calvanese et al. 2019; Arentz-Hansen et al. 2000; R. P. Anderson et al. 2000) y ha sido utilizado como inductor de respuesta innata en ensayos *in vitro* (con líneas celulares como CaCo-2) (Nanayakkara et al. 2018; Palová-Jelínková et al. 2013; M. Vittoria Barone et al. 2011) o *ex vivo* (trabajos sobre piezas de biopsia duodenal) (Hüe et al. 2004; Maiuri et al. 2003). Existen diversos estudios que caracterizaron los efectos *in vitro* de p31-43 en los que se mostró que induce muerte celular; estrés oxidativo; localización y retraso madurativo de vesículas y producción de citoquinas proinflamatorias, entre otros efectos (Nanayakkara et al. 2018; Frossi et al. 2017; Paoella et al. 2017; Zimmermann et al. 2014; Iacomino et al. 2013; Caputo et al. 2012; Abadie et al. 2011; M. Vittoria Barone et al. 2011; Luciani et al. 2010; Maria Vittoria Barone et al. 2007; Green y Jabri 2006; Maiuri et al. 2003). Los estudios con p31-43 no sólo se restringen a su rol en la inducción de mecanismos efectores en el intestino delgado, sino

también a desordenes neurológicos. En un modelo murino de epilepsia se observó que p31-43 era capaz de exacerbar la neurotoxicidad inducida (Gerace et al. 2017).

En la actualidad, no existe un único modelo que logre reproducir todas las etapas características de la EC, sino que estudian solo algunas de las etapas segregadas de la patología, en particular la respuesta adaptativa. En este trabajo de tesis nos enfocamos en el estudio de la respuesta inmune temprana en EC, utilizando un modelo murino de enteropatía, donde se evalúa los efectos biológicos del péptido de  $\alpha$ -gliadina p31-43.

En los experimentos iniciales de este trabajo de tesis emplee un modelo murino de enteropatía previamente desarrollado por nuestro laboratorio (Araya et al. 2016, 2014). Este modelo consistió en la realización de una microcirugía con anestesia fija y sobrevida, en la que se administró p31-43 directamente en el lumen intestinal. Este protocolo experimental nos permitió asegurarnos de la dosis exacta que se administra al intestino, además de descartar variaciones en los resultados debido a diferencias en el tránsito gastrointestinal o en la degradación por enzimas digestivas de estos péptidos. A pesar de que contábamos con un protocolo ya establecido, es innegable que un procedimiento quirúrgico es invasivo. Es por esto que decidimos introducir cambios con la finalidad de mejorar el bienestar animal. En primer lugar, se modificó el tipo de anestesia utilizada, pasando de anestesia fija con Ketamina/Xilacina a anestesia inhalatoria mediante isoflurano transportado en una corriente de oxígeno medicinal. El isoflurano es un anestésico que produce inducción más rápida en roedores y a diferencia de la anestesia con Ketamina/Xilacina, no altera la temperatura ni la frecuencia respiratoria durante el periodo quirúrgico, siendo el anestésico de elección (Jiron et al. 2019).

Las principales desventajas de la microcirugía, desde el punto de vista del bienestar animal, es la baja sobrevida de los animales (aproximadamente 70 %) y el



hecho de que una cirugía con sobrevida es un procedimiento complejo en el cual el animal puede experimentar dolor. Desde el punto de vista experimental, la realización de una microcirugía puede inducir una respuesta inflamatoria debido a la misma técnica quirúrgica. Finalmente, desde el punto de vista operativo, esta técnica requiere como mínimo de dos personas altamente entrenadas en procedimientos quirúrgicos y anestésicos; así como también equipamiento específico para anestesia inhalatoria y una cabina de seguridad biológica de tipo 2 con salida de aire al exterior.

Tomando todos estos factores en consideración, decidimos refinar nuestros procedimientos y desarrollar un modelo basado en la administración intragástrica del estímulo. El mismo presenta importantes ventajas con respecto al modelo anterior como ser sobrevida del 100% de animales; ausencia de artefactos inflamatorios relacionados con la cirugía; disminución en la complejidad del procedimiento (se requiere solo una persona entrenada para su realización); es una técnica más simple y económica ya que no se requiere equipamiento específico como el sistema de administración del anestésico. Solo es necesario contar con sondas intragástricas adecuadas y adquirir el entrenamiento en la administración lo que la hace una técnica apta para su traslado a otros laboratorios. Sin embargo, entre las desventajas de la administración oral de p31-43, podemos mencionar que se desconoce la dosis efectiva de estímulo que llega al lumen del intestino delgado proximal. Debido a esto decidimos realizar una curva dosis-respuesta evaluando diferentes concentraciones de p31-43 administradas por vía intragástrica y analizar los parámetros morfológicos, relación V/C y número de IELs (Figura 13). Mediante este estudio pudimos determinar que la dosis optima de trabajo con el péptido p31-43 es 20µg/ratón. Además, es importante resaltar que estos ensayos confirman que el aumento del número de IELs es un marcador muy sensible en la respuesta a p31-43 ya que se observó que a menores dosis de estímulo con p31-43, se incrementó significativamente

el número de IELs. En el caso de la relación V/C solo se observaron cambios significativos a una dosis de 20µg/ratón. Esto puede deberse a que las señales necesarias para el aumento de IELs son de magnitud menor a las requeridas para un profundo cambio histológico o bien se conforman a partir de diferentes vías. Siendo este un punto de interés de nuestro futuro trabajo.

Hemos desarrollado el modelo de enteropatía de ratones de la cepa C57BL/6, sin embargo, nos interesó reproducir el modelo en ratones BALB/c pertenecientes a otra cepa con otro background genético y en particular con otra microbiota. Se utilizaron ratones provinieron del bioterio de la Universidad Federal de Minas Gerais en Belo Horizonte, Brasil y fueron amablemente cedidos por la Dra. Caetano Faria. Se observó que en esta cepa se indujeron cambios significativos en la morfología intestinal, aunque menos marcados que los obtenidos en la cepa C57BL/6. Estos resultados fueron relevantes para nuestro trabajo ya que evidencian que nuestro modelo puede ser transferible a animales de esta cepa. El hecho de que los cambios hayan sido estadísticamente significativos, pero menos marcados que los obtenidos en C57BL/6, puede deberse a diferencias en la microbiota entre bioterios. Existen estudios que demuestran que diferentes cepas de ratones poseen diferente composición de microbiota. Es más, la misma cepa de ratones, pero proveniente de diferentes proveedores, posee una composición de microbiota diferente (Choo et al. 2017; Ericsson et al. 2015; Hoy et al. 2015; O'Connor, O'Herlihy, y O'Toole 2014; Brinkman et al. 2013; Campbell et al. 2012; Kovacs et al. 2011; Benson et al. 2010; Deloris Alexander et al. 2006). Diferencias basales en la composición de microbiota pueden, entre otros efectos generar respuestas diferenciales de la función de la barrera epitelial intestinal (Horne et al. 2019),. volveremos sobre este punto más adelante.

Dado que p31-43 induce efectos muy rápidos, como aumento de mediadores proinflamatorios luego de 4 horas post-estimulación y cambios en la morfología intestinal luego de 16 horas de administración, se pensó que éstos deberían estar mediados por un receptor de superficie celular que genere señales intracelulares. Sin embargo, como mencionamos, no se ha podido identificar el receptor de p31-43 (Paoletta et al. 2018). Por lo que, en este trabajo de tesis nos interesó evaluar si los mecanismos de daño inducidos por p31-43 eran dependientes de su secuencia de aminoácidos. Para responder a esta pregunta evaluamos distintos péptidos de síntesis que poseían la misma composición aminoacídica que p31-43 pero difieren en la secuencia, uno tenía la secuencia invertida y el otro al azar. Observamos que, a ambas concentraciones evaluadas, solo p31-43 generó disminución de la relación V/C y aumento del número de IELs. Además, sólo p31-43 indujo mediadores proinflamatorios (IFN $\beta$  e IFN $\gamma$ ) luego de 4 horas post estimulación. Estos ensayos demuestran que la secuencia de p31-43 es determinante de los efectos biológicos observados (Gómez Castro et al. 2019).

Considerando la rápida respuesta *in vivo* frente a la administración de p31-43, decidimos estudiar las vías de señalización involucradas. En especial las de IFNs tipo I. Esta vía está exacerbada en mucosa intestinal de pacientes con EC. Se observó que los niveles de transcritos de MxA, gen de la vía de IFNs tipo I, se encontraban aumentados en el epitelio de pacientes celíacos, así como también que la inducción de IL-15, en respuesta a infecciones virales era dependiente de IFN $\alpha$ R (Iacomino et al. 2016). Además, en un modelo experimental *in vivo* se evidenció la relación entre infección por retrovirus, donde está involucrada esta vía, y la pérdida de tolerancia hacia antígenos dietarios (Bouziat et al. 2017). En línea con estas observaciones, decidimos evaluar ratones IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup> tratados con p31-43, que no mostraron cambios en la relación V/C, o el número

de IELs. Por lo que podemos concluir que esta vía es necesaria para el desarrollo de enteropatía inducida por p31-43.

Otras vías también han sido evaluadas. Estudios recientes describen que p31-43 se une a la membrana de mastocitos de pacientes celíacos e inducen la activación de la vía de NF $\kappa$ B (Frossi et al. 2017). También se ha propuesto que p31-43 imita la respuesta innata inducida por virus de doble cadena de ARN, interfiere con el tráfico vesicular de TLR7 en compartimientos endosomales, y esto puede activar la señalización de MAP quinasas vía TLR7/MyD88 que desencadena en la activación de la vía de MAP quinasas (Nanayakkara et al. 2018). En línea con estas observaciones, en nuestro modelo experimental demostramos que los mecanismos de enteropatía y muerte celular inducidos por p31-43 requieren de MyD88, y que no dependen de TLR4 (Araya et al. 2016).

Finalmente, en este capítulo se estudió si la administración de p31-43 podía modificar el curso de la respuesta inmune frente a desafíos posteriores con gluten. Para esto se emplearon ratones de la cepa NOD-DQ8, los cuales poseen un aumento de susceptibilidad a reacciones autoinmunes y expresan la molécula de HLA-DQ8 fuertemente asociada a EC (E. Marietta et al. 2004). Estos ratones fueron empleados por el grupo de la Dra. Verdú (Universidad McMaster, Canadá) en el desarrollo de un modelo de enteropatía. Para esto, se depletaron parcialmente las células T regulatorias mediante un anticuerpo anti-CD25 y posteriormente se administró toxina colérica y gliadina por 3 semanas. Se observó un descenso en la relación V/C y un aumento moderado en el número de IELs (Galipeau et al. 2011). El modelo de enteropatía mediante administración intraluminal de p31-43 empleando cirugía, fue evaluado previamente por nuestro grupo en estos animales NOD-DQ8 y observamos que luego de 12 horas post administración de p31-43, no se produjeron cambios en la morfología intestinal sino solo un aumento

moderado en el número de IELs. Llamativamente hubo un incremento en la longitud de las vellosidades sin que hubiera cambios en las criptas (Araya et al. 2016). En el presente trabajo, evaluamos la inducción de enteropatía a las 16 horas mediante administración intragástrica. De manera análoga, a lo observado anteriormente, los animales tratados con p31-43 no presentaron cambios en la morfología a tiempos cortos, pero si hubo un aumento significativo en el número de IELs (Araya et al. 2014).

Dado que estudios previos con estos animales reportaron que la sensibilización con gliadinas resultó en una disfunción de la barrera intestinal y en una enteropatía leve (Galipeau et al. 2011), evaluamos si podía generarse una consecuencia funcional a largo plazo. Para esto, ratones NOD-DQ8 recibieron por vía intraluminal, mediante cirugía, 10µg/ratón de p31-43 y luego de 12 horas se los desafió por vía intragástrica con 2mg de gluten/ratón, 3 veces por semana durante dos semanas en total y se analizaron parámetros morfológicos y alteraciones en la funcionalidad de la barrera intestinal. Se observó una disfunción de la barrera intestinal evidenciada mediante un aumento en la permeabilidad paracelular y una enteropatía intestinal leve, con disminución en la relación V/C y aumento en el número de IELs.

Nuestro objetivo en el presente trabajo fue evidenciar si el pretratamiento con p31-43 era capaz de condicionar un ambiente proinflamatorio que desencadenara una respuesta adaptativa ante sucesivos desafíos con el antígeno. Para esto, se introdujeron cambios en el diseño experimental. El péptido p31-43 fue administrado por vía intragástrica (20µg/ratón), y partir de las 16 horas se desafió con gluten (2mg/ratón), tres veces por semana durante cuatro semanas. Al finalizar las cuatro semanas no se observaron cambios en la relación V/C, ni en el número de IELs. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en el laboratorio de la Dra. Verdú en los que se observó que ratones NOD-DQ8 considerados limpios y libres de patógenos (SPF) no

presentaron variaciones en el número de IELs luego del desafío con gluten, pero si lo hacían los animales libres de gérmenes (“Germ-free”) (Galipeau et al. 2015). Tampoco se detectaron cambios en los parámetros asociados a la permeabilidad intestinal entre ninguno de los grupos: “pretratamiento con PBS + gluten” o “pretratamiento con p31-43 + gluten”.

En cuanto a la proliferación de células de bazo de animales NOD-DQ8, se pudo observar que solo el grupo de ratones NOD-DQ8 pretratados con p31-43 evidenciaron un marcado incremento en el porcentaje de células T de bazo vivas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> proliferantes. Sin embargo, este incremento no fue específico. Este fenómeno puede deberse a que p31-43 no es reconocido específicamente por células T pero puede contribuir a la creación de un entorno proinflamatorio que ayude a que se incremente la proliferación de células de bazo, luego de múltiples desafíos con gluten durante 4 semanas.

En estudios realizados en ratones HLA-DQ2 transgénicos, que expresaban un receptor TcR humanizado restringido a DQ2, se evaluó la inducción de proliferación en bazo y en NLM luego de la administración de Gliadina o de OVA como control. Este grupo observó que los animales DQ2 a los cuales se les administró gliadina no presentaban proliferación específica en ganglios mesentéricos pero si en el bazo, tanto luego de 48 como de 72 hs post re-estimulación. Estas células de bazo en división poseían un perfil proinflamatorio Th1, caracterizado por la secreción de IFN $\gamma$  e IL-6 (Pré et al. 2011). En nuestro caso, por cuestiones técnicas, no pudimos analizar las citoquinas producidas por estas células proliferantes, sin embargo, resultaría de gran interés en el futuro.

## **6. Conclusiones**

El modelo desarrollado previamente por nuestro grupo que empleó la inoculación intraluminal de estímulos mediante microcirugía fue funcional para evaluar los mecanismos de daño inducidos por p31-43, las dosis necesarias y su comparación con los péptidos controles, evitando complejidades en la interpretación de los resultados debido a efectos de la degradación a lo largo del tracto gastrointestinal. De esta forma, pudimos comprobar que la inoculación directa en el lumen es capaz de producir cambios en la morfología intestinal, así como también la inducción de mediadores proinflamatorios tempranos tanto en ratones C57BL/6 como BALB/c, aun en diferentes bioterios.

A su vez, realizamos un cambio relevante en el procedimiento pues pudimos evidenciar que p31-43, administrado intraluminalmente, induce enteropatía. El efecto biológico fue observado a la concentración habitualmente usada, pero llamativamente también a una concentración 10 veces menor. Lo cual sugiere que p31-43 tiene alta potencia tóxica.

Por otro lado, evidenciamos que la enteropatía inducida por p31-43 es específica de su secuencia aminoacídica, ya que evaluando dos péptidos de síntesis con la misma composición de aminoácidos que p31-43 pero una secuencia al azar y otra invertida, solo p31-43 induce enteropatía. Finalmente evaluamos los efectos del péptido de gliadinas en un modelo crónico de enteropatía y no observamos alteraciones en la morfología intestinal, ni en la permeabilidad de la barrera intestinal luego de 4 semanas de desafíos con gluten. Sin embargo, el péptido p31-43 pudo inducir un ambiente proinflamatorio que llevó a mayor porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> vivas comparado con animales pretratados con el control (PBS), es llamativo que este aumento en la cantidad de células proliferantes totales no fue específico para PT-gliadina.





## CAPÍTULO II

# ANÁLISIS DE MECANISMOS DE ESTRÉS Y MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR EL PÉPTIDO

p31-43



# Capítulo II: Análisis de mecanismos de estrés y muerte celular inducidos por el péptido p31-43

## 1. Introducción

Debido a su secuencia aminoacídica, las proteínas de trigo son parcialmente degradadas por las enzimas del tracto gastrointestinal. Un caso particular es el péptido p31-43, que puede generarse a partir de  $\alpha$ -gliadinas como producto de la digestión por enzimas gástricas, pancreáticas y del ribete en cepillo (Iacomino et al. 2013; Mamone et al. 2007). Es de destacar que, hasta la fecha, no se ha podido encontrar un receptor que medie su internalización (Paoletta et al. 2018). Por esto, se propuso que p31-43 podría ingresar a la célula mediante una interacción directa con la membrana celular (Di Pisa, Chassaing, y Swiecicki 2015). En cambio, Zimmerman et al. mostraron que p31-43 es capaz de ingresar a células CaCo-2 mediante un proceso activo que requiere la presencia de  $Ca^{+2}$  en el medio de cultivo (Zimmermann et al. 2014). Luego de su ingreso, el p31-43 se localiza en vesículas endocíticas tempranas e interfiere con su tráfico normal hacia vesículas tardías, efecto que produce estrés de retículo (M. Barone, Troncone, y Auricchio 2014). De manera análoga, estudios en fibroblastos obtenidos a partir de piel de pacientes celíacos, mostraron que p31-43 ingresa por endocitosis a la célula (Paoletta et al. 2017). Estos estudios mostraron que, si bien p31-43 ingresa y media diversos efectos en la célula muy rápidamente, se desconoce el mecanismo molecular involucrado.

Los primeros ensayos *ex vivo*, con piezas de biopsias duodenales de pacientes celíacos, mostraron que el péptido es capaz de inducir apoptosis de células epiteliales mediante la activación de la respuesta inmune innata (Maiuri et al. 2003). También se

observaron efectos tóxicos de p31-43 en células CaCo-2, que fueron relacionados con aumento en la permeabilidad celular (Iacomino et al. 2013) y polimerización del citoesqueleto de actina (Clemente et al. 2003; Iacomino et al. 2013). En el estudio de señales y mediadores de la respuesta innata, se observó que p31-43 activa la vía de IFNs tipo I, con incremento de MxA e IFN $\alpha$ , en intestino delgado de pacientes celíacos. Además, en células CaCo-2, se observó que el péptido puede actuar de manera similar a un estímulo viral utilizando las vías TLR7/MyD88 que participarían activando MAPKs, ERK y C-jun (Nanayakkara et al. 2018). Por otro lado, se describió que el tratamiento con p31-43 demoró el tráfico de los compartimientos endosomales tempranos y esto se relacionó con la activación de la vía de TLR7 (Nanayakkara et al. 2018).

Otros estudios *in vitro* mostraron que p31-43 induce estrés celular y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en mastocitos y células CaCo-2 (Frossi et al. 2017; Luciani et al. 2010). La producción de ROS depende de diversas reacciones enzimáticas que ocurren en varios compartimentos celulares, incluyendo el citoplasma, las mitocondrias y los peroxisomas (Forrester et al. 2018; Ray, Huang, y Tsuji 2012; Thannickal y Fanburg 2000). La pérdida de la homeostasis del estado redox está íntimamente relacionada con el desarrollo de desórdenes intestinales. ROS regula procesos de proliferación, migración y diferenciación del epitelio, modulando las vías de señalización wnt/ $\beta$ -catenina y Notch (Pérez et al. 2017). En particular, en intestino delgado de pacientes con EC activa, el estrés oxidativo media múltiples efectos como apoptosis y diferenciación alterada del epitelio (Zimmer et al. 2010), además de marcado descenso en los niveles de expresión de enzimas anti-oxidantes y anti-inflamatorias (Rothen et al. 2007). Ensayos *in vitro* mostraron que las gliadinas aumentan los niveles de productos de la peroxidación lipídica, como la oxidación del glutatión, demostraron que existe una relación entre el estado redox del enterocito y su susceptibilidad al daño

por péptidos de gliadinas (Rivabene, Mancini, y De Vincenzi 1999). Además, se describió que la acumulación de p31-43 en vesículas produce aumento de los niveles de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , peroxinitritos y peróxidos lipídicos, en biopsias duodenales de pacientes celíacos (Zimmer et al. 2010). En base a estas observaciones, se postula que en la mucosa intestinal, el estrés oxidativo podría ser relevante para los mecanismos involucrados en el daño tisular (Diosdado, Van, y Wijmenga 2005; Sabatino et al. 2001; Rivabene, Mancini, y De Vincenzi 1999). Si bien, actualmente existen múltiples modelos *in vitro* para el estudio de los efectos de p31-43 no se reportaron estudios *in vivo* asociados al desarrollo de enteropatía y a la producción de mediadores proinflamatorios, que evidencien que este péptido desencadena mecanismos de daño en la mucosa intestinal. Es por esto, que en este capítulo nos interesó evaluar mecanismos de daño asociados a muerte celular y estrés, inducidos por p31-43. Tanto en el modelo murino descrito en el capítulo anterior, como en líneas celulares humanas que podrían ser relevantes para el estudio de etapas tempranas de la patogenia de EC.



## **2. Hipótesis**

“P31-43 induce mecanismos de estrés y muerte celular en un modelo murino de enteropatía y en líneas celulares humanas.”

## **3. Objetivos específicos**

- ❖ Estudiar la inducción de mediadores de estrés luego de la administración de p31-43 en un modelo murino de enteropatía.
- ❖ Estudiar la inducción de mediadores de estrés luego del tratamiento con p31-43 en las líneas celulares THP-1.
- ❖ Determinar si la inoculación de p31-43 en el modelo murino de enteropatía genera apoptosis.
- ❖ Evaluar si el tratamiento de líneas celulares THP-1 y HT29 con p31-43 genera apoptosis.





## **4. Resultados**

### **4.1. Sección I: Evaluación de la inducción de estrés y muerte celular en un modelo murino de enteropatía**

#### ***4.1.1. Inducción de estrés en un modelo murino de enteropatía***

Como mencionamos, se ha descrito una relación entre la producción de especies reactivas del oxígeno en células epiteliales y la citotoxicidad inducida por gliadinas (Luciani et al. 2010; Monguzzi et al. 2019). Por esa razón, nos interesó evaluar si p31-43 es capaz de inducir moléculas asociadas a estrés como especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/NOS), en el modelo *in vivo* de enteropatía.

En estos ensayos, p31-43 fue administrado a ratones machos de la cepa C57BL/6 de 7 a 8 semanas de edad y se sacrificaron a 4 o 16 h post estimulación. Posteriormente se tomaron muestras de intestino delgado las cuales se procesaron para obtener una suspensión celular de la fracción epitelial. Para el análisis de la expresión de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) se utilizó la sonda DCFDA (2',7' - diclorofluorescin diacetato). Esta sonda detecta los aniones hidroxilos, radicales peroxilos y la actividad de otras especies reactivas de oxígeno dentro de la célula, generando un compuesto fluorescente medible mediante citometría de flujo. Además, se utilizó Ioduro de propidio (IP) para poder diferenciar las poblaciones de células muertas de las vivas con producción de ROS.

#### 4.1.1.1. Producción de ROS en células epiteliales intestinales aisladas de ratones tratados con p31-43

Mediante citometría de flujo se analizaron células epiteliales aisladas de intestino delgado proximal de ratones. En la Figura 23 se presenta la estrategia utilizada para el estudio, la misma nos permitió diferenciar tres poblaciones celulares: las células doble positivas ROS<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, las células simple positivas ROS<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> y la proporción de células muertas positivas para yoduro de propidio, IP<sup>+</sup>.

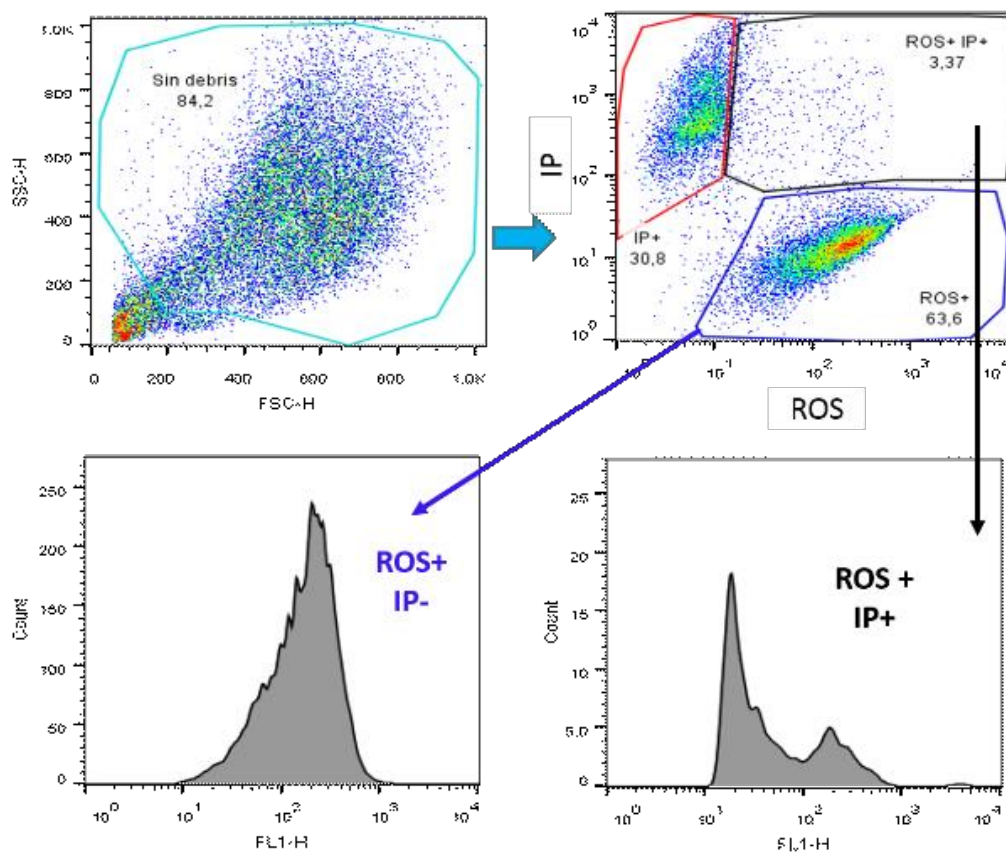


FIGURA 23. ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE POBLACIONES POR CITOMETRÍA DE FLUJOS PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Estrategia de análisis de los datos de citometría de flujo de la fracción epitelial aislada de intestino delgado. En primer lugar, se seleccionó mediante FSC/SSC, la población celular de interés sin debris. Dentro de esta población se graficó en el eje Y FL3-(IP) y en el eje X FL1-(ROS). Posteriormente, se graficaron tres regiones utilizando los controles simple marca, que diferencian tres poblaciones: ROS<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>; ROS<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>; IP<sup>+</sup>. Se graficó un histograma de FL1, en las primeras dos poblaciones y se midió la mediana para cada muestra.

En células epiteliales aisladas del intestino delgado de ratones tratados por vía intragástrica con p31-43 o PBS, no se observaron diferencias entre las poblaciones doble positiva ROS<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, ni en las células IP<sup>+</sup> luego de 4h (Figura 24 A y C) o 16 h (Figura 24 D y F) post administración. En el caso de la población ROS<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> a las 4 h se pudo observar una tendencia al aumento de ROS en el grupo de ratones tratados con p31-43 comparado con el grupo control con PBS (Figura 24 B), llamativamente a las 16 h se evidenció una tendencia a la disminución de ROS en el grupo de ratones tratados con p31-43 comparados con el control (Figura 24 E). Sin embargo, estas variaciones no fueron significativas.

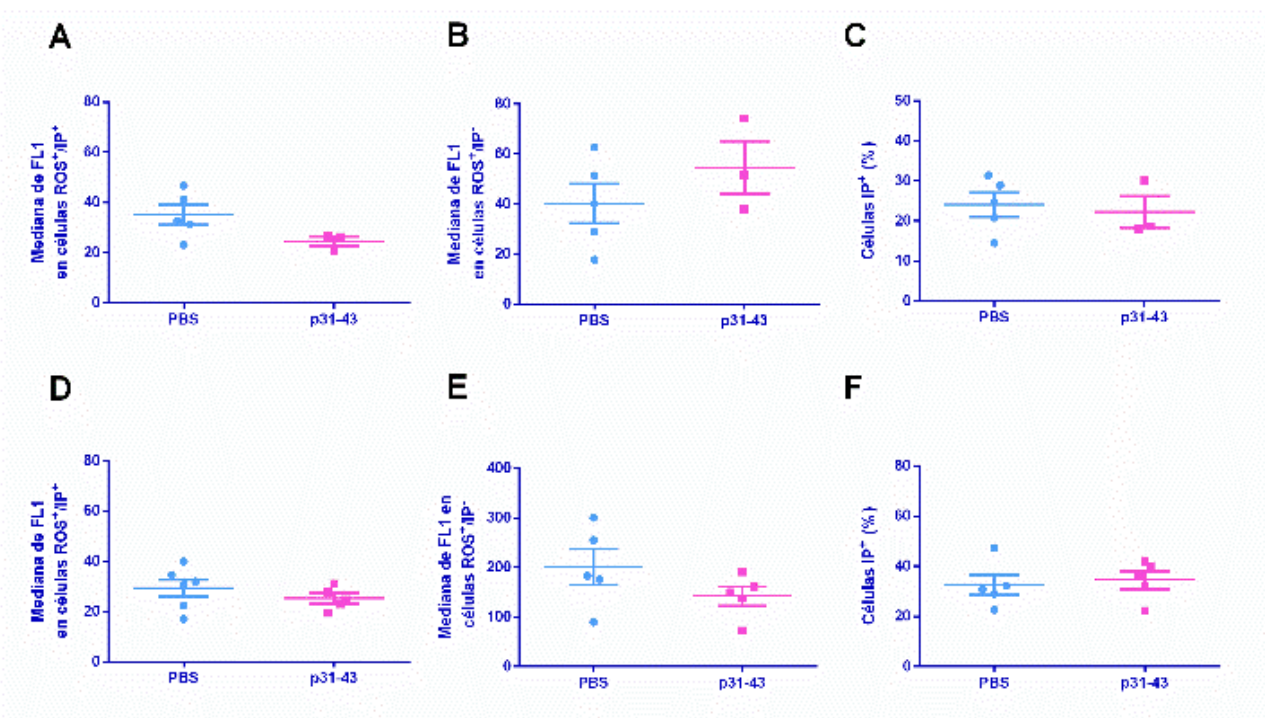


FIGURA 24. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN LA FRACCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES 4H Y 16 H POST TRATAMIENTO CON P31-43

Análisis por citometría de flujo de células de la producción de ROS y muerte (Ioduro de propidio) en células epiteliales extraídas del intestino delgado proximal de ratones C57BL6 tratados con p31-43 o PBS. **Panel superior:** células aisladas de ratones luego de 4 horas de tratamiento. **Panel inferior:** Células aisladas de 16 horas. **A/C.-** Mediana de FL1 para la población ROS<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>. **B/E.-** Mediana de FL1 para la población ROS<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>. **C/F.-** Porcentaje de células IP<sup>+</sup>. En grupos de ratones tratados con p31-43 o PBS como controlen todos los experimentos se utilizaron 5 animales por grupo. Estadística: Test T-Student no pareado.

#### 4.1.1.2. Estudio de BIP en intestino delgado de ratones tratados con p31-43

BIP es una molécula de vida media larga ( $\geq 48$  horas) cuya función se encuentra asociada al estrés del retículo endoplasmático (RE) causado por la acumulación de proteínas mal plegadas (Sano y Reed 2013). En condiciones homeostáticas, BIP se encuentra unida a PERK y ATF6 para mantenerlas inactivas, pero cuando aumenta la cantidad de proteínas mal plegadas en el interior del RE se inicia el proceso denominado UPR (respuesta a proteínas mal plegadas) para reestablecer la homeostasis. Si estos mecanismos no son suficientes, se produce un cambio en la respuesta hacia señales pro-apoptóticas que llevarán a la muerte, a aquellas células que se encuentren dañadas irreversiblemente. En este proceso, BIP se libera de los complejos con PERK y ATF6 (Wang et al. 2011) se transloca al citoplasma y se asocia a la membrana plasmática donde puede actuar como un receptor celular para proteínas pro-apoptóticas como Par-4, que son capaces de activar la cascada FADD/Caspasa-8/Caspasa-3 (Burikhanov et al. 2009).

Con el fin de evaluar si la administración intragástrica de p31-43, puede inducir estrés celular *in vivo*, se estudió la expresión de BIP como indicador de estrés de retículo mediante inmunofluorescencia de cortes de intestino delgado proximal de ratones luego de 16h de tratamiento.

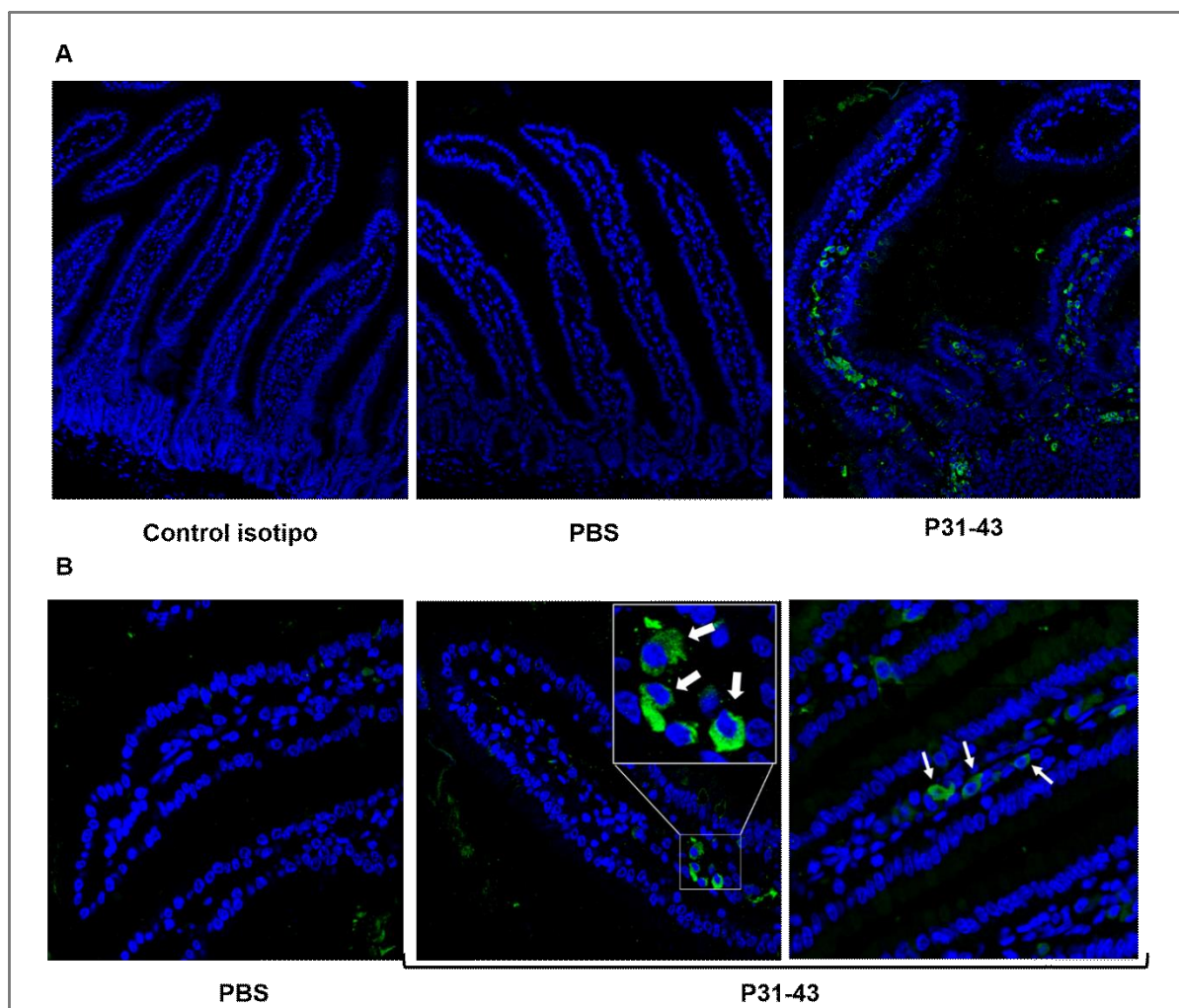


FIGURA 25. EXPRESIÓN DE BIP EN INTESTINO DELGADO

Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de intestino delgado de ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad luego de 16h de la administración vía intraluminal de p31-43 (10  $\mu$ g/ratón) o PBS. Secciones de 5  $\mu$ m se marcaron con un anticuerpo anti-BIP (dilución 1 /100, Cell signalling) conjugado a FITC o su correspondiente control de isotipo. Se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal Leica. **A.**-Imágenes representativas a 20X de control de isotipo, ratones tratados con PBS y ratones tratados con p31-43. **B.**-Imágenes representativas a 63X. Las flechas indican células BIP<sup>+</sup>. Se muestra un zoom con tres células positivas para BIP en donde se observa su localización citoplasmática.

En la figura 25 A, se muestran imágenes representativas de la marcación de BIP en muestras de intestino delgado de animales tratados con p31-43 o PBS, además del control de isotipo correspondiente. En la figura 25 B, se muestran imágenes a mayor aumento de regiones con células que expresaban BIP distribuida en el citoplasma. Utilizando estas imágenes se realizó un recuento, de las células BIP<sup>+</sup> por área total, que

muestra un aumento significativo de células BIP<sup>+</sup>/Área en intestino delgado de ratones tratados con p31-43 (Figura 26).

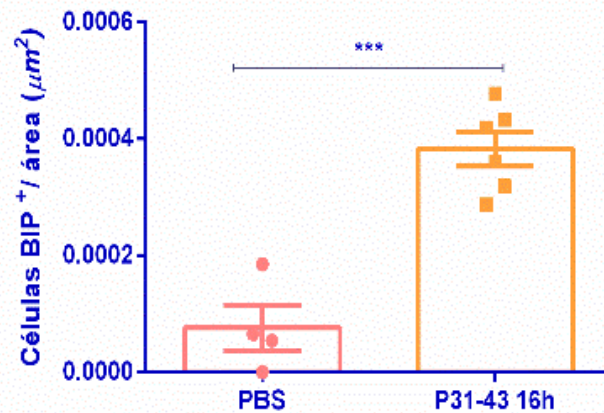


FIGURA 26. P31-43 INDUCE UN AUMENTO DE CÉLULAS BIP EN INTESTINO DELGADO

Se analizó por inmunofluorescencia la expresión de BIP en cortes de intestino delgado de ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad luego de 16h de administración intraluminal de p31-43 (10 μg/ratón) o PBS. Sobre las imágenes de inmunofluorescencia se realizó el recuento de las células BIP<sup>+</sup> por área total tejido (tanto de epitelio como *lamina propria*) medida utilizando el software Image J. Estadístico: Test de Student \*\*\*p<0,001

#### 4.1.2. Análisis de muerte celular inducida por p31-43 en un modelo murino de enteropatía

Como mencionamos, p31-43 tiene diferentes efectos biológicos, entre los cuales se ha descrito la inducción de muerte celular (Maiuri et al. 2003). Dado que este es un fenómeno de sumo interés en nuestro modelo de enteropatía, realizamos estudios para profundizar el conocimiento sobre las vías de muerte celular inducidas por p31-43.

En primer lugar, se utilizó la técnica de TUNEL que es una determinación de elección cuando se desea detectar la presencia de células apoptóticas en el tejido. Este método se basa en la marcación de los extremos libres de ADN, productos de la fragmentación enzimática. Por otro lado, se complementaron estos análisis con estudios de la expresión a nivel de RNA mensajero de dos moléculas indicadoras de eventos pro y anti apoptóticos,

bax y bcl-2, respectivamente, en células epiteliales aisladas de intestino. Se realizó la determinación de la expresión de estos mediadores mediante PCR cuantitativa, para luego obtener una relación bax/bcl-2.

#### 4.1.2.1. Inducción de muerte celular en células epiteliales extraídas de ratones tratados con p31-43

Se ha descrito en la bibliografía que la muerte celular se encuentra aumentada en el epitelio intestinal de pacientes con EC activa (Moss et al. 1996). Aunque nuestro modelo experimental no intenta reproducir la patogenia de EC creemos que, en parte, los mecanismos de muerte celular en el intestino murino podrían ser equivalentes a los que se observan en el intestino delgado de pacientes con EC. Considerando resultados previos de nuestro grupo donde mostramos que, luego de 12 horas post estimulación intraluminal con p31-43, se produjo un incremento de apoptosis en intestino delgado (Araya et al. 2016), nos interesó evaluar la inducción de muerte en células epiteliales intestinales aisladas de ratones C57BL/6 tratados con p31-43 o PBS, administrados intraluminalmente y analizados luego de 16 horas.

Para esto, se realizó el análisis por citometría de flujo de células epiteliales aisladas de intestino delgado, marcadas con Anexina V e Ioduro de propidio (IP). Este análisis da información sobre los mecanismos de apoptosis temprana y tardía respectivamente. En la Figura 27 A, se observa que p31-43 indujo un aumento significativo del porcentaje de células epiteliales doble positivas (Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>), comparado con los animales del grupo control.

Por otro lado, se determinó mediante PCR cuantitativa, la relación bax/bcl-2 en las mismas células epiteliales aisladas de intestino, luego de 16h de tratamiento (Figura 27 B). En este caso, se observó una tendencia al aumento del cociente bax/bcl-2 en ratones tratados con p31-43. En conjunto, ambos estudios evidencian un incremento en la muerte celular en animales tratados con p31-43.

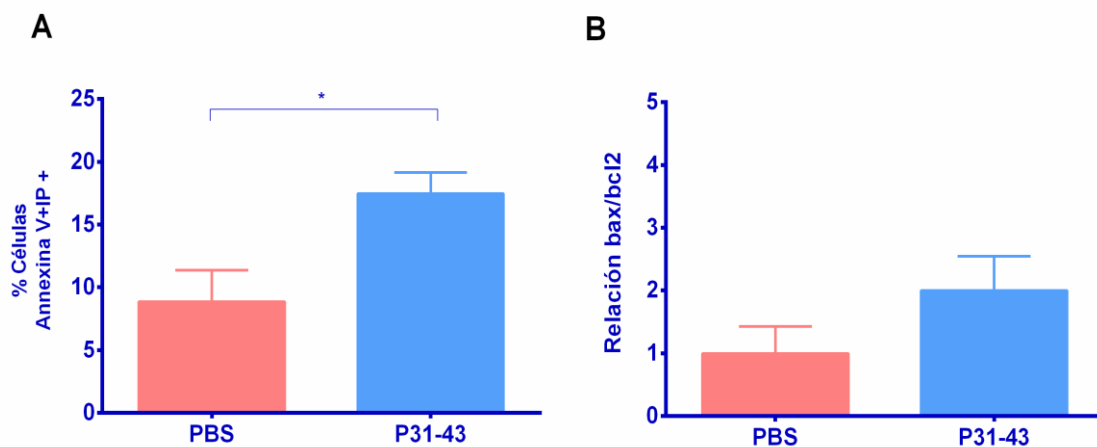


FIGURA 27. P31-43 INDUCE *IN VIVO* APOPTOSIS EN CÉLULAS DEL EPITELIO INTESTINAL. Ratones C57BL/6 machos de 7-8 semanas de edad fueron tratados con p31-43 (10µg/ratón) o PBS mediante administración intraluminal. Luego de 16 h los animales se sacrificaron y se tomaron muestras de intestino delgado. **A.-** A partir de 10 cm de intestino se aisló la fracción epitelial intestinal y se marcaron con Anexina V e Ioduro de propidio para posterior análisis por citometría de flujo. N=5 ratones por grupo, test T-Student \*P<0,05. **B.-** Análisis de RNAm de bcl-2 y bax a partir de RNA total obtenido de células epiteliales intestinales mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados se analizaron mediante el método  $\Delta\Delta^{CT}$  y se expresaron como relación bax/bcl-2. N= 4 ratones por grupo. Análisis estadístico: test T-Student.

#### 4.1.2.2. Evaluación de muerte celular en el tejido intestinal murino inducida por p31-43

Con el fin de evaluar el proceso de muerte celular, decidimos aplicar la técnica de TUNEL en piezas de intestino delgado de ratones luego de 4h o 16h de administración intragástrica de p31-43 o PBS. En la Figura 28, se presentan imágenes representativas



obtenidas con un microscopio de fluorescencia y un microscopio confocal, en donde se observan células TUNEL<sup>+</sup> tanto en epitelio, como en *lamina propria*.

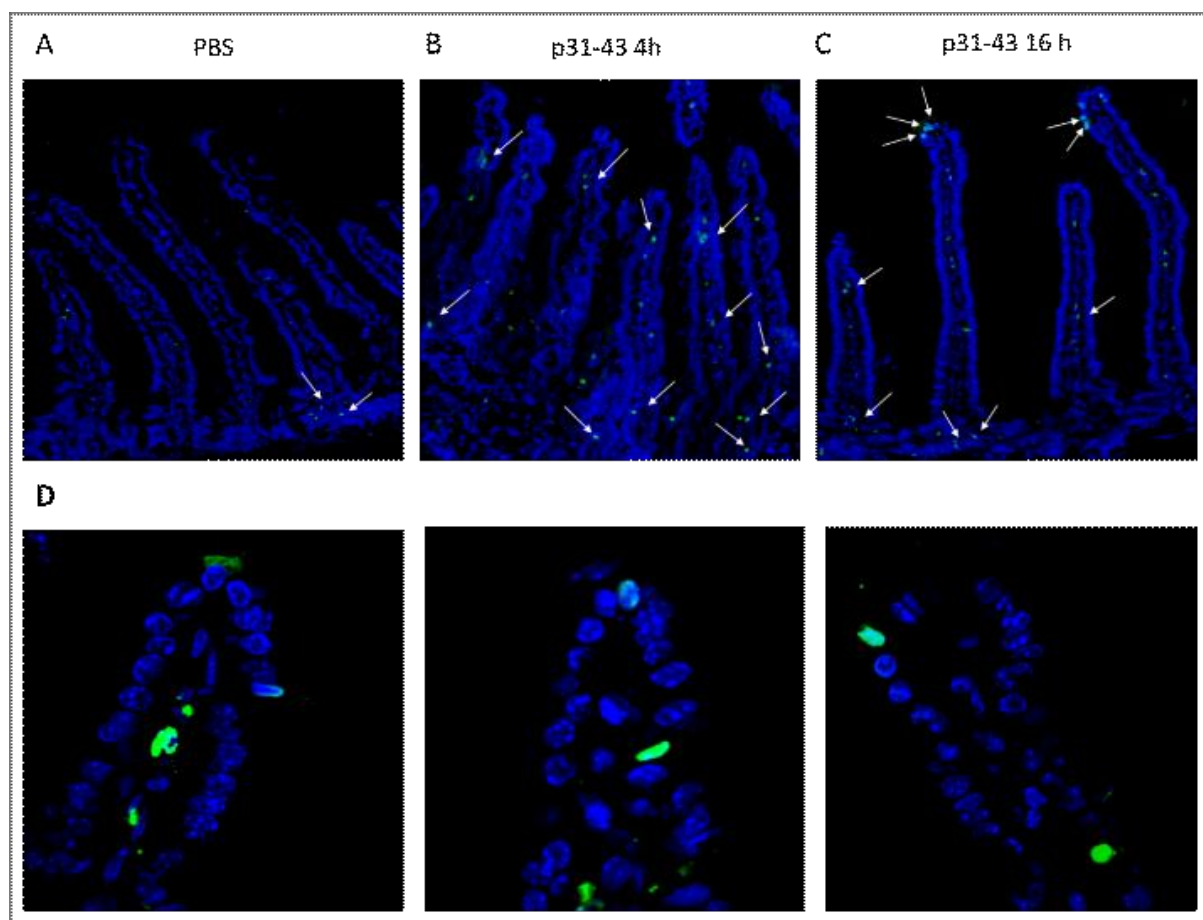


FIGURA 28. DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR POR TUNEL EN INTESTINO DE ANIMALES TRATADOS POR VÍA INTRAGÁSTRICA CON P31-43

Se muestran imágenes representativas obtenidas en microscopio de fluorescencia (Nikon Ti Eclipse), de cortes de intestino delgado de ratones C57BL/6 tratados por vía oral con p31-43 (20  $\mu$ g/ratón) o PBS. Luego de 4 o 16 horas de la administración, las muestras de intestino fueron incluidas en parafina y se procedió a realizar la técnica de TUNEL. El análisis de imágenes se realizó con el software Image J y se superpusieron los canales: verde (TUNEL) y azul (DAPI, núcleos). Aquellas células que presentaron co-localización entre verde y azul, aparecerán de color cian y se consideraron TUNEL positivas. En el **panel superior A, B, C.** se observan imágenes a 20X de los diferentes tratamientos (PBS, p31-43 a 4 y 16 horas) y se señalan las células túnel positivas con flechas blancas. En el **panel inferior** observamos imágenes tomadas con el microscopio confocal Olympus FV1000 de modo de obtener imágenes con mayor resolución a un aumento de 63X. **D.** Se pueden observar células color cian en las puntas de las vellosidades.

En estas imágenes se puede observar una mayor proporción de células positivas en los animales tratados con el péptido. Se realizó una evaluación cuantitativa mediante

el recuento de células TUNEL<sup>+</sup> por área total de tejido y se observó un aumento significativo de estas células, en el intestino delgado de ratones tratados con p31-43, tanto a 4 como a 16 horas (Figura 29).

Hemos mostrado que la administración de p31-43, induce un aumento significativo del porcentaje de células epiteliales doble positivas para Anexina/Ioduro de propidio, aumento de la relación proapoptótica (bax/bcl-2), y aumento del número de células TUNEL<sup>+</sup>.

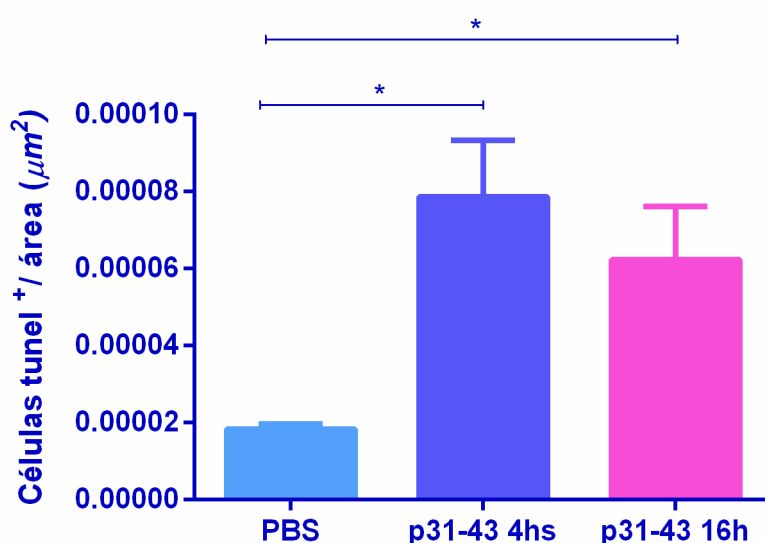


FIGURA 29. P31-43 ADMINISTRADO POR VÍA ORAL INDUCE MUERTE CELULAR EN INTESTINO DELGADO PROXIMAL

Se realizó un recuento de células TUNEL<sup>+</sup> sobre imágenes obtenidas como se indica en la figura 28, utilizando el software Image J, midiendo el área total de tejido y evidenciando las células TUNEL<sup>+</sup> (color cian). Se graficó el promedio del recuento de un mínimo de 5 imágenes por ratón. Al valor promedio de cada grupo de tratamiento, se les restó un control negativo de marca inespecífica de nucleótidos, realizado con muestras que no fueron tratadas con la enzima desoxittransferasa terminal (Tdt). N=5 ratones por grupo. Análisis estadístico ANOVA no pareado. \*p < 0,05.

## 4.2. Sección II Evaluación de mecanismos de muerte celular y estrés inducido por administración de p31-43 *in vitro*

### 4.2.1. Análisis de la producción de ROS *in vitro*

En la bibliografía se encuentran descripciones del aumento de ROS inducido por péptidos de gliadinas (Luciani et al. 2010; Claudio Giovannini et al. 2003). Con el fin de evaluar si en nuestro sistema se podía evidenciar la inducción de ROS por p31-43, se

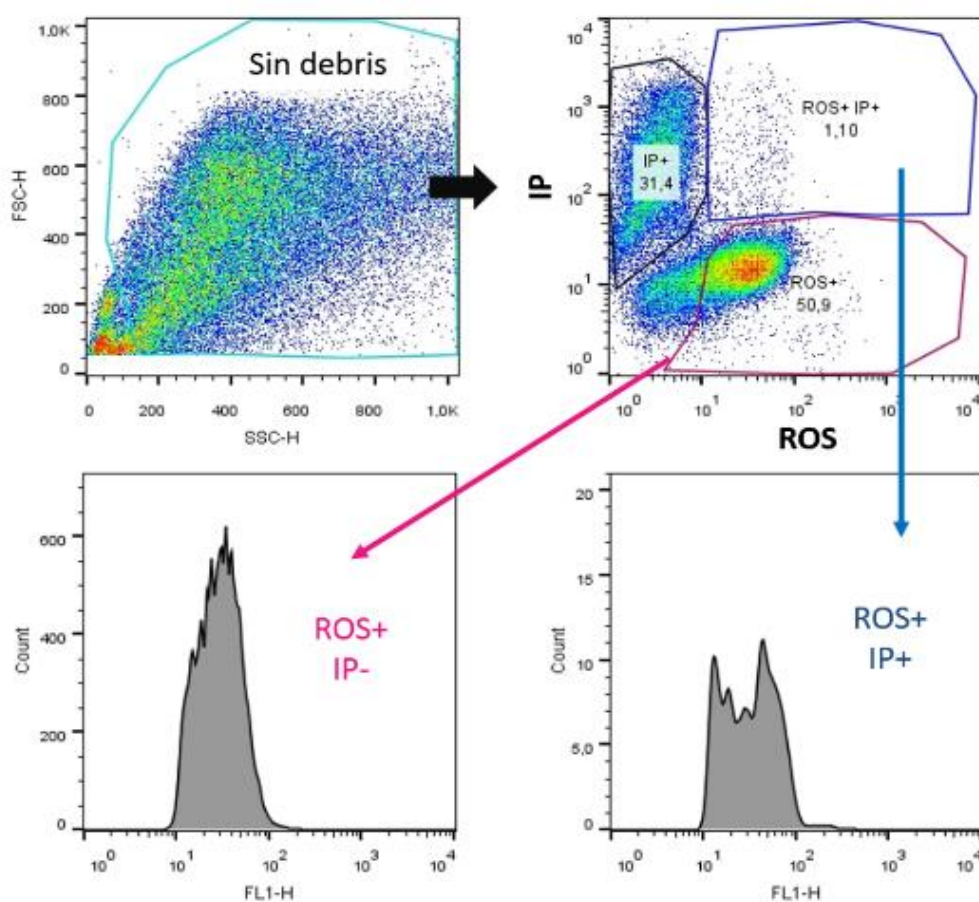


FIGURA 30. ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE POBLACIONES POR CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Estrategia de análisis por citometría de flujo de la producción de ROS en líneas celulares de interés. En primer lugar, se seleccionó mediante FSC/SSC, la población sin debris. Luego esta población se dividió en IP y ROS. Posteriormente se identificaron dos regiones utilizando los controles simple marca, que diferencian dos poblaciones: ROS<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>, ROS<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>. Se graficó un histograma de FL1, de las primeras dos poblaciones y se midió la mediana para cada una. En el análisis estadístico se compararon los promedios de las medianas para cada tratamiento mediante un test T-Student no pareado.

estudió una líneas celular denominada THP1 (modelo de monocito/macrófago humano). Las células fueron incubadas por 6h con p31-43 (100 µg/mL) o medio de cultivo y luego fueron marcadas con la sonda DCFDA. En el análisis por citometría de flujo se incluyó la marca con yoduro de propidio para diferenciar las células muertas. La estrategia de selección de poblaciones se presenta en la Figura 30. Se evaluaron las poblaciones ROS<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup> y las células vivas ROS<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> y el porcentaje de células muertas (IP<sup>+</sup>) para cada tratamiento.

El tratamiento con p31-43 durante 6 h no indujo variaciones en la producción de ROS en células THP1 (ROS<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup> o ROS<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>) con respecto al control (Figura 31 A, B). Tampoco se observaron diferencias entre tratamientos, en cuanto a la proporción de células IP<sup>+</sup> (Figura 31 C).

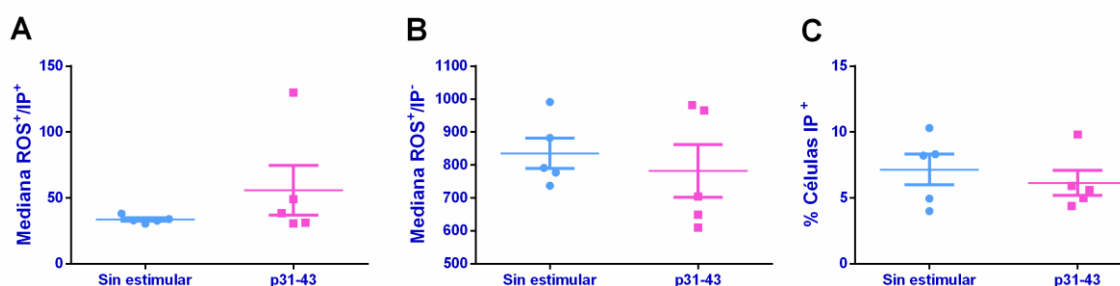


FIGURA 31. LOS NIVELES DE ROS EN CÉLULAS THP-1 NO VARÍAN LUEGO DE 6 HORAS DE TRATAMIENTO CON P31-43

Células THP1 fueron incubadas por 6h con p31-43 (100µg/mL) o medio de cultivo (sin estimular), luego, se marcaron con la sonda DCFDA para evaluar ROS y con yoduro de propidio (IP). Se grafica el resultados del análisis de citometría de flujo: **A.**- expresión de ROS (mediana) en células IP y **B.**- expresión de ROS (mediana) en células IP, **C.**- Proporción de células IP<sup>+</sup>. N:5. Estadístico: Test Student no pareado.

#### 4.2.1.1. Análisis de inducción de apoptosis *in vitro* en líneas celulares THP-1 y HT29

Para extender el análisis de la inducción de muerte celular por p31-43 decidimos evaluar las células HT29 y THP1, mediante la marcación Anexina V/Ioduro de propidio. Observamos que las células de la línea THP-1 tratadas con p31-43 presentaron una mayor proporción de células Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, mientras que no se observaron diferencias en las células HT29 (Figura 32 A).

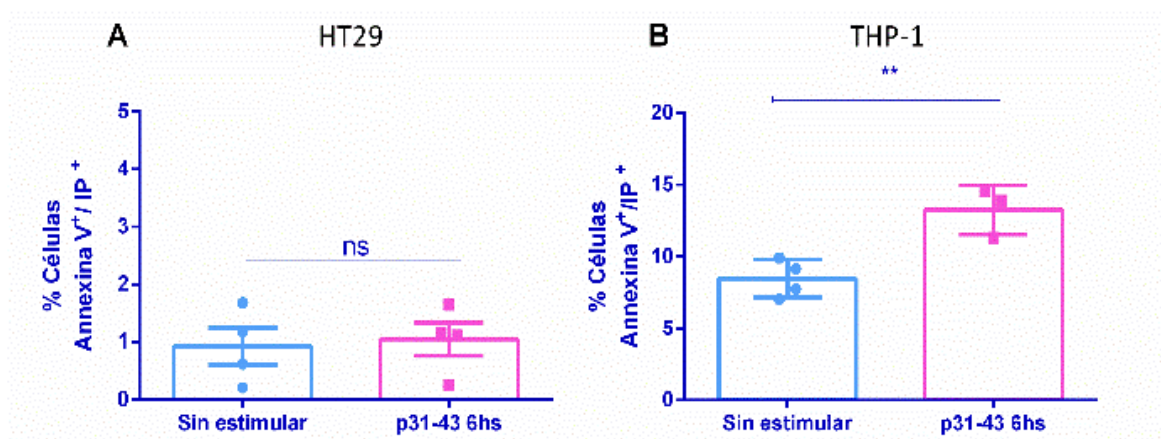


FIGURA 32. EL PÉPTIDO P31-43 INDUCE MUERTE CELULAR EN CÉLULAS THP-1 PERO NO EN CÉLULAS HT29

A.- Células HT29 y B.- THP1 se incubaron con p31-43(100 µg/mL) o medio por 6. Las células se marcaron con Anexina V y con Ioduro de propidio (IP). Posteriormente se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células AnexinaV<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup> para las diferentes líneas celulares. Estadístico utilizado: Test T-student no pareado \*\* p<0,05.

#### 4.2.2. Despolarización del potencial de membrana mitocondrial en células THP-1

Una característica distintiva de las etapas tempranas de la muerte celular programada es la disrupción mitocondrial activa, asociada a la vía intrínseca de apoptosis. Esta disrupción, incluye cambios en el potencial de membrana y alteraciones del potencial REDOX de las mitocondrias. Estas modificaciones en el potencial de

membrana son debidas a la apertura de poros de transición que alteran permeabilidad mitocondrial (MPTP), permitiendo el pasaje de iones y moléculas pequeñas. Esto trae como consecuencia un desacople de la cadena respiratoria y la liberación del citocromo c y otros factores al citosol. Estos fenómenos son los que determinan la pérdida del potencial de la membrana externa mitocondrial, conocido como MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). Se ha mostrado en la línea celular THP-1, que la inducción de apoptosis se relaciona con la liberación del citocromo c, formación del MPTP y reducción en el potencial de membrana mitocondrial (Zhang et al. 1998).

Como describimos en la sección anterior, se observó inducción de apoptosis en nuestro modelo de enteropatía murino tanto en tejido intestinal entero, como en células epiteliales aisladas de ratón. En esta sección, nos interesó evaluar el proceso de muerte estudiando la integridad de la mitocondria a través de su potencial de membrana.

Para evaluar si el tratamiento con p31-43 induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, se utilizó una sonda denominada JC-1. Si el potencial de membrana está intacto, la sonda se encontrará en su forma monomérica y se podrá detectar su fluorescencia en el canal FL1 (verde); mientras que si se pierde el potencial de membrana mitocondrial, la sonda formará agregados, que serán detectados en el canal FL2 (Rojo).

Se evaluaron células THP1 incubadas durante 6h con p31-43 o medio de cultivo y se utilizó un desacoplante de la cadena de electrones (FFCP) como control positivo de despolarización. En la figura 32, se muestra que el tratamiento con p31-43 induce despolarización de la membrana mitocondrial comparada con las células sin estimular.

En la presente sección, se evaluó el efecto *in vitro* de p31-43 sobre la inducción de muerte celular, producción de ROS y cambios en el potencial de membrana. No se observaron cambios en los niveles de ROS evaluados *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, se

observó un incremento en la producción de BIP en tejido total de ratones tratados intraluminalmente con p31-43. Además, se evidenció que p31-43 indujo alteración en la integridad de la mitocondria y muerte celular tanto en células extraídas de un modelo murino de enteropatía, como en una línea celular de monocitos/macrófagos humanos.

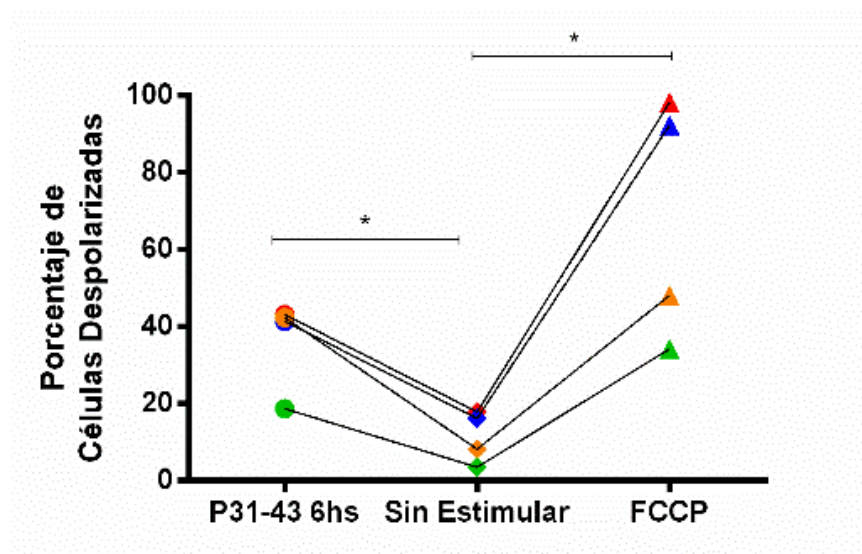


FIGURA 33. P31-43 INDUCE CAMBIOS EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

En la figura se presenta el índice de despolarización de cuatro ensayos independientes entre sí, de células THP-1 incubadas con p31-43 o medio durante 6 horas. Los colores presentados en cada grupo (verde, azul, rojo y amarillos) representan la media del porcentaje de células THP-1 despolarizadas para 3 replicados de cada ensayo independiente. Se utilizó un control de despolarización FCCP, para definir el punto de corte de las células que se encontraban con el potencial de membrana mitocondrial intacto. Análisis Estadístico: ANOVA. \* $p < 0,05$ .





## 5. **Discusión**

En este capítulo, evaluamos algunas propiedades biológicas de p31-43 asociadas a la inducción de estrés y muerte celular, tanto *in vivo* en el modelo murino de enteropatía; como *in vitro* en líneas celulares epiteliales y de monocitos/macrófagos humanos.

El proceso de apoptosis es un mecanismo central para el mantenimiento de la integridad del epitelio de intestino delgado, en especial el recambio normal de enterocitos. La diferenciación de enterocitos se inicia en las criptas donde se encuentran las células madre que generan los distintos tipos de células que constituyen el epitelio intestinal (enterocitos, células caliciformes, células de Paneth). Los enterocitos se van desplazando, siguiendo el eje desde la base de la vellosidad hasta la punta, este camino toma 4-5 días (Potten 1975). En la punta se inicia un proceso de apoptosis, que en este caso se denomina anoikis (Frisch y Francis 1994). Si bien en el caso de EC, se considera que existe un proceso de apoptosis exacerbado que conlleva a una pérdida masiva de enterocitos, los mecanismos de muerte han sido poco estudiados.

Existen múltiples estudios *in vitro* que relacionan a las gliadinas con la muerte celular. Por ejemplo, utilizando una línea epitelial intestinal (Caco-2), se mostró que una fracción de gliadinas digeridas con pepsina-tripsina (PT-gliadinas) indujo apoptosis (C Giovannini et al. 2000) y que la misma estaba mediada por la vía de FAS-FAS ligando (Claudio Giovannini et al. 2003).

Por otro lado, se propone que los IELs fuesen los principales responsables de inducir muerte celular de los enterocitos; y que las gliadinas podrían potenciar esa actividad citotóxica. En ese sentido, se observó la inducción de una clara respuesta inmune innata cuando se incubaron piezas de biopsias de pacientes celíacos con péptidos

de gliadinas, en particular el péptido p31-43 (Maiuri et al. 2003). Este fue el primer trabajo en el que se mostró que p31-43 tiene diversos efectos inflamatorios y potenciadores de la respuesta inmune en intestino. Se observó en ensayos *ex vivo*, activación de linfocitos T, inducción de la expresión de IL-15, ciclo oxigenasa 2 y apoptosis de enterocitos. Además, se observó en células Caco-2, que p31-43 es responsable del reordenamiento de actina, aumento en la proliferación celular, y de alteración del tráfico de vesículas (Barone et al. 2010). Esto a su vez, produjo aumento en la activación del receptor de factor de crecimiento (EGFR), que produce aumento de la tasa proliferativa como se observa en la enteropatía (Barone, Troncone, y Auricchio 2014; Barone et al. 2007).

Tanto p31-43, como p55-87, son capaces de ingresar en células Caco-2, pero solo p31-43 se localiza en compartimientos endosomales tempranos. Esta acumulación se observó también en piezas de tejido intestinal de pacientes celíacos (Barone y Zimmer 2016). Esta acumulación en vesículas tempranas interfiere con el tráfico normal, modifica la fisiología de los endosomas, y como consecuencia produce estrés oxidativo que podría desencadenar la muerte celular (Luciani et al. 2010).

En este sentido, nuestros resultados *in vitro* muestran que p31-43 es capaz de inducir apoptosis, observada como un aumento significativo en la proporción de células Anexina V<sup>+</sup> / Ioduro de propidio<sup>+</sup>, en células THP-1, pero no en células HT29. Los resultados de los ensayos *in vitro* con células epiteliales adherentes (Caco-2, HT29) encontrados en la bibliografía son discordantes, poniendo en evidencia la dificultad de obtener resultados consistentes probablemente debido a la dificultad de homogeneizar los cultivos de estas líneas celulares, así como la manipulación previa a los ensayos de

medida de apoptosis (Monguzzi et al. 2019; Caputo et al. 2012; Zimmer et al. 2010; Mazzarella et al. 2008; Giovannini et al. 2003; Giovannini et al. 2000).

Aquí, mostramos que ratones tratados con p31-43, presentan un aumento en la proporción de células apoptóticas en las células epiteliales aisladas del intestino delgado. Este constituyó el primer reporte de un ensayo *in vivo*, donde se observó aumento en la proporción de células Anexina V<sup>+</sup>/Ioduro de propidio<sup>+</sup>, que estuvo acompañado de aumento en la relación bax/bcl-2. Además, mediante la técnica de TUNEL, demostramos aumento de la muerte celular en tejido intestinal de ratones tratados por vía oral con p31-43, tanto en *lamina propria* como en el epitelio.

Dado los diferentes efectos proinflamatorios descritos para p31-43, analizamos su capacidad de generar estrés celular y producción de ROS. La producción de ROS ocurre durante procesos homeostáticos de metabolismo celular. Si esta producción de ROS es mayor que 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 enteropatía, esto se hace evidente en pacientes con EC activa, donde se encontraron altos niveles plasmáticos de ROS (Moretti et al. 2018).

La producción de ROS y GSH (glutación), evaluada en células Caco-2 incubadas con PT-gliadinas durante distintos tiempos, mostró que no se producen cambios en los niveles de ROS a tiempos cortos, pero luego de 24h se encontró apoptosis, incremento de ROS y descenso en el contenido de GSH, sugiriendo que la producción de ROS es un evento tardío y que se asocia a la inducción de apoptosis (Giovannini et al. 2003).

Con el objetivo de caracterizar la inducción de ROS en nuestro sistema, estudiamos células epiteliales aisladas de intestino delgado de animales tratados con p31-43. En estos

ensayos, no se observaron diferencias en los niveles de ROS en los tratamientos de 4h y 16h, resultados que podrían ser comparables a los comentados anteriormente (Giovannini et al. 2003), quienes mostraron aumento de ROS luego de 24h. Sin embargo, otros estudios realizados en células Caco-2 mostraron incremento de ROS a las 12h (Monguzzi et al. 2019). Aunque es de destacar que, en este caso, se empleó PT-gliadinas y no p31-43 y que las concentraciones usadas fueron 50-100 veces mayores que las usadas en nuestro estudio. Las diferencias experimentales encontradas son muy notorias y muy posiblemente sean la explicación de los resultados divergentes.

Una aproximación experimental diferente es el empleo de *C. elegans* tratados con gliadinas por 24h, donde se observó incremento en la producción de ROS, locomoción reprimida, y velocidad de bombeo reducida (Lim et al. 2018). Este es un modelo interesante pero el uso de una fracción de gliadinas muy compleja limita la interpretación de los resultados.

Estudios previos de nuestro grupo pusieron en evidencia que la mucosa duodenal en pacientes celíacos no tratados evidencia signos de estrés celular, en particular por el 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.

Habiendo observado que p31-43 induce estrés de RE, se estudió si p31-43 podía generar otras alteraciones en la fisiología celular como pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Para esto, empleando la sonda JC-1, se evidenció que las células THP1 incubadas con p31-43, presentaron despolarización mitocondrial.

## 6. Conclusiones

En este capítulo, mostramos que el tratamiento de ratones por vía oral con p31-43 induce muerte celular en células del intestino delgado. Esto se evidenció como un aumento de células TUNEL<sup>+</sup> en la mucosa intestinal, aumento en la proporción de células epiteliales Anexina V<sup>+</sup>/ Ioduro de propidio<sup>+</sup>; así como también mediante el aumento de la expresión de ARNm de mediadores pro-apoptóticos. En ensayo *in vitro* se observó que p31-43 indujo muerte celular y despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, en los estudios *in vivo* de células epiteliales aisladas, ni en los ensayos *in vitro* observamos diferencias en los niveles de (ROS) en los tiempos estudiados. Los estudios *in vivo* mostraron que p31-43 es capaz de inducir procesos asociados a estrés celular, evidenciados como un aumento en la expresión de BIP en intestino delgado proximal.

En conjunto, estos resultados muestran que, a tiempos cortos, p31-43 puede desencadenar múltiples vías efectoras para causar daño celular. En particular, la administración intragástrica de p31-43 induce estrés y muerte celular en intestino delgado proximal.



## CAPÍTULO III

# CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE P31-43 Y SU IMPLICANCIA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA





# Capítulo III: Caracterización estructural de p31-43 y su implicancia en la respuesta inflamatoria

*Los estudios realizados en este capítulo fueron realizados en colaboración con la Dra. Georgina Herrera del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas - IQUIFIB (UBA-CONICET), Eduardo Daniel Prieto del Laboratorio de Nanoscopía y Fisicoquímica de Superficies (INIFTA-CONICET), Exequiel Barrera y de Sergio Pantano del grupo de Simulaciones Biomoleculares del Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.*

## **1. Introducción**

Las gliadinas junto con las gluteninas constituyen los componentes de la harina de trigo, que forman el gluten (estructura viscoelástica), que determina características esenciales en el proceso de amasado y en la panificación en general. Por su impacto en alimentación humana y en los desarrollos tecnológicos, la estructura de estas proteínas ha sido muy estudiada (Peter R. Shewry y Halford 2002). Mientras que las gliadinas son solubles en etanol 60%, las gluteninas requieren medios más agresivos y la presencia de agentes reductores para su solubilización. Las gliadinas se presentan como monómeros y pueden clasificarse en cuatro grupos, dependiendo de su movilidad a pHs bajos en un gel de electroforesis ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadinas de mayor a menor movilidad) (Wieser 1996). Estas proteínas se caracterizan por tener dominios repetitivos con alto contenido en prolina y glutamina, que han llevado a denominarlas prolaminas. Existen descripciones estructurales que mostraron que las regiones repetitivas adoptan estructuras tipo poliprolina II (PPII) y giros  $\beta$  reversos (Peter R. Shewry y Halford 2002). Dado que no

existe una descripción de las características estructurales del péptido p31-43, decidimos iniciar estudios biofísicoquímicos y de simulación con expertos en el área.

Una herramienta indispensable en el estudio de la estructura secundaria de las gliadinas en solución acuosa es el dicroísmo circular (DC). Este posee dos ventajas principales: es posible analizar pequeñas cantidades de muestra en buffers fisiológicos y además permite monitorear alteraciones estructurales resultantes de cambios de pH, temperatura o fuerza iónica (Doderó 2011). El fundamento de la técnica se basa en que moléculas ópticamente activas (como proteínas o ADN) pueden absorber luz polarizada hacia la izquierda ( $A_L$ ) y luz polarizada a la derecha ( $A_R$ ). El DC mide la diferencia de absorbancia entre  $A_L$  y  $A_R$ . Según la ley de Lambert-Beer, la absorbancia se puede definir como:  $A = \epsilon CL$ . Siendo  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar, C la concentración y L el camino óptico. Si la muestra en la solución absorbe la luz polarizada a la izquierda o la derecha de manera diferencial, poseerá diferentes coeficientes de extinción molar ( $\epsilon_L$  y  $\epsilon_R$ ), es decir, un  $\Delta\epsilon$ . Sin bien el DC mide esta diferencia, generalmente se reporta en termino de elipticidad ( $\theta$ ) en grados. Existe una relación numérica entre la absorbancia y la elipticidad dada por la ecuación:  $\theta = \Delta A \cdot 33,0$ . Para poder comparar los resultados entre diferentes muestras es necesario considerar la molaridad. Es por esto que se utiliza la elipticidad molar definida como  $[\theta] = M \cdot \theta / (100 \cdot C \cdot L)$  *degree.cm<sup>2</sup>/decimol*. Siendo M el peso molecular, C la concentración (*degree.cm<sup>3</sup>*) y L el camino óptico en cm. La elipticidad molar puede graficarse contra la longitud de onda y se obtiene un espectro de DC.

Existen espectros clásicos de DC para poder identificar las estructuras secundarias de las proteínas. En la figura 34 podemos observar espectros en el UV lejano (178-250 nm) asociados con varios tipos de estructuras secundarias como  $\alpha$ -hélice, hojas- $\beta$ -paralelas o antiparalelas, giros- $\beta$ , poliprolina II o estructuras irregulares al azar. En los espectros de CD se pueden observar bandas de elipticidad positiva ( $\epsilon_L - \epsilon_R > 0$ ) o negativa ( $\epsilon_L - \epsilon_R < 0$ ). Los espectros de DC de estructuras secundarias tipo  $\alpha$ -hélice puras se caracterizan por poseer dos bandas negativas a 222nm y 208 nm y una banda positiva a 193 nm. Las estructuras secundarias tipo hojas- $\beta$  puras poseen una banda negativa a 218 nm y una banda positiva a 195 nm aproximadamente. Las estructuras puramente irregulares tendrán una banda positiva a 217 nm y una banda negativa a 200 nm.

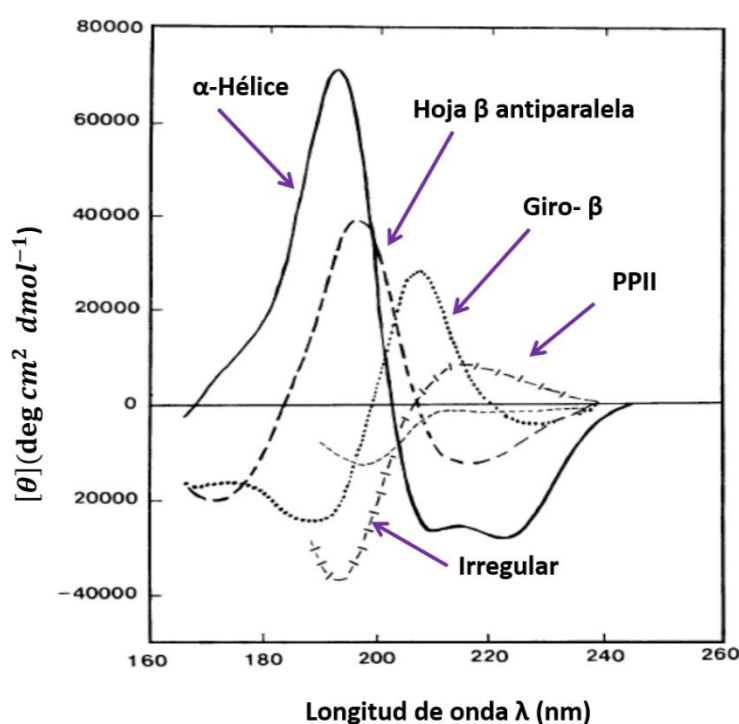


FIGURA 34. ESPECTRO EN EL UV LEJANO ASOCIADO CON VARIOS TIPOS DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE CADENAS PÉPTIDICAS.

Línea sólida (—): estructura tipo  $\alpha$ -hélice; línea punteada larga (— —): estructura tipo hoja  $\beta$  antiparalela; línea punteada (...): estructura tipo giros  $\beta$ , línea cruzada (|-|-): estructura tipo poly- prolina II (PP II), línea con rayas cortas (----): estructura irregular. Figura extraída de Kelly et al. 2005.

Finalmente, las estructuras tipo poliprolina II presentarán una banda negativa alrededor de 206 nm y una positiva alrededor de 225 nm (Doderó 2011).

La estructura de poliprolina II es una hélice levógira compuesta por tres residuos de prolina por vuelta, la misma posee la característica distintiva de no formar enlaces intramoleculares de hidrogeno. Estudios de DC realizados en  $\alpha$ -gliadina mostraron que un tercio de la proteína poseía conformación helicoidal. Además, se describió que el espectro de DC indicó la presencia de tres bandas, dos bandas negativas a 222 y 208nm y una banda positiva a 192 nm, esto sugirió la presencia de una estructura helicoidal (Kasarda, Bernardin, y Gaffield 1968).

Se postuló que los dominios repetitivos de las  $\alpha$ -gliadinas contenían una mezcla de poliprolina II y giros  $\beta$ -reversos y que las regiones no repetitivas estaban ricas en estructuras tipo  $\alpha$ -helicoidales (Urade, Sato, y Sugiyama 2018).

Resultados de ensayos *in vitro* descritos en la bibliografía y obtenidos en nuestro modelo *in vivo*, mostraron que p31-43 ejerce diversos efectos biológicos muy rápidamente. Sin embargo, en la actualidad no se ha identificado un receptor celular (Paolella et al. 2018), solo se conoce que la respuesta generada no es dependiente del reconocimiento por células T (Nanayakkara et al. 2018; Frossi et al. 2017; Paolella et al. 2017; Zimmermann et al. 2014; Iacomino et al. 2013; Caputo et al. 2012; Abadie et al. 2011; Barone et al. 2010; Luciani et al. 2010; Barone et al. 2007; Green y Jabri 2006; Maiuri et al. 2003). Es por esto que consideramos que el estudio de la estructura de p31-43 podría contribuir a comprender como un péptido de pocos aminoácidos, es capaz de mediar respuestas inductoras de daño de forma muy rápida. En este capítulo se utilizaron métodos biofísicos y de simulación computacional para su caracterización. Además,

basados en los datos estructurales obtenidos, se propuso comenzar la caracterización de las vías inflamatorias implicadas en el daño inducido por p31-43.



## **2. Hipótesis**

“La estructura secundaria de p31-43 induce agregación y formación de oligómeros que pueden explicar la inducción de diversos efectos biológicos”

## **3. Objetivos específicos**

- ❖ Caracterizar la estructura secundaria predominante del péptido p31-43.
- ❖ Evaluar si la estructura predominante de p31-43 se encuentra en equilibrio con otras estructuras secundarias.
- ❖ Determinar si el péptido forma agregados en soluciones acuosas y caracterizar estos oligómeros mediante análisis biofísicoquímicos y microscopía.
- ❖ Realizar una caracterización estructural del péptido por modelado *in silico*.
- ❖ Analizar la implicancia del inflamasoma NLRP3 en la enteropatía inducida por oligómeros de p31-43.





## **4. Resultados**

### **4.1. Sección I: Caracterización estructural de p31-43**

#### **4.1.1. *Análisis de la estructura secundaria de p31-43 mediante dicroísmo circular***

En un estudio utilizando DC, que las  $\alpha$ -gliadinas presentaban estructuras secundarias del tipo poliprolina II y que los espectros obtenidos variaban de acuerdo a la concentración de proteína utilizada (Urade, Sato, y Sugiyama 2018). Por esta razón, decidimos evaluar soluciones de p31-43 en agua milliQ a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200 y 500  $\mu$ M). En este ensayo, se utilizó una temperatura constante de 4°C ya que esta describe que, a esta temperatura, las estructuras secundarias de  $\alpha$ -gliadina se estabilizan (Kasarda, Bernardin, y Gaffield 1968). Como se puede observar en la figura 35 A, el p31-43 generó un espectro de DC con una banda negativa a los 203 nm y una banda positiva a 225 nm, esta señal es característica de una estructura secundaria tipo poliprolina II (Brigida Bochicchio y Tamburro 2002). Por otro lado, comparado con las otras concentraciones, se observó que a 200  $\mu$ M, el espectro de DC de p31-43 sufrió un marcado incremento de la banda negativa (figura 35 A). Para determinar si este efecto se debió a una transición conformacional, se realizó un estudio por DC con soluciones de 200  $\mu$ M de p31-43 en un rango de temperaturas (entre 4°C y 37°C). El incremento de temperatura produjo un desplazamiento hipocrómico de la banda negativa de 203 nm a 205 nm (figura 35 B). Además, la banda positiva a 225nm presentó reducción en su señal. Estas características, así como la presencia de un punto isodicroico (punto en el que los espectros convergen) a 210 nm indican que la estructura poliprolina II se encuentra en equilibrio conformacional con otra estructura (Peter R. Shewry y Halford 2002).

Considerando que el espectro de DC es el resultado de la señal derivada de todo el péptido y que ésta puede ser una combinación de diferentes estructuras secundarias, se utilizó la sustracción matemática de los espectros de modo de evaluar transiciones conformacionales (Pepe y Bochicchio 2013). En la figura 35 C, se muestra la resultante de la sustracción de los espectros a las temperaturas máxima y mínima (37°- 4°C) a 200µM. Se observó una banda negativa a 220 nm y una positiva a 200 nm, lo que es indicativo de coexistencia de conformaciones diferentes. Se pudo observar la presencia de estructura tipo poliprolina II, dominante en todas las condiciones ensayadas, aunque a mayores temperaturas se evidenció un equilibrio con estructuras del tipo  $\beta$ .

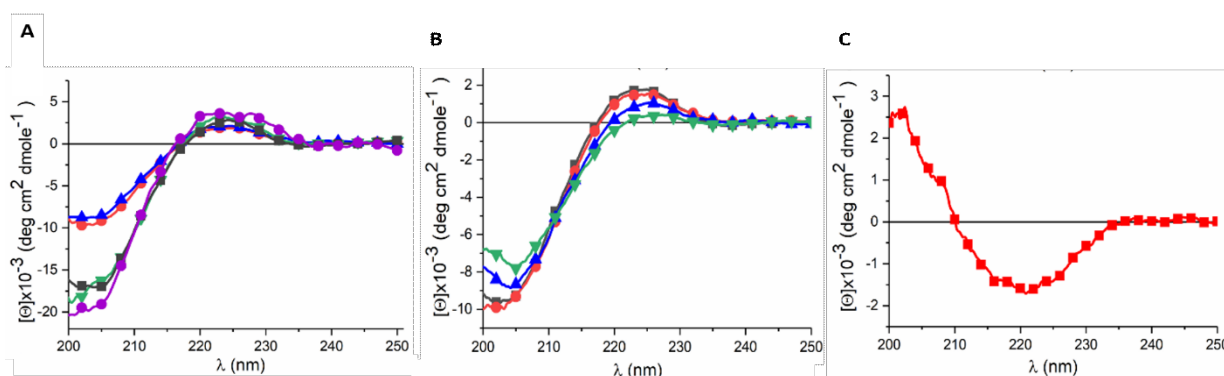


FIGURA 35. EL PÉPTIDO P31-43 POSEE UNA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL TIPO POLIPROLINA II

**A.-** Espectro de dicroísmo circular obtenido utilizando soluciones de (●) 10 µM (▼) 50 µM, (■) 100 µM, (▲) 200 µM and (●) 500µM de p31-43 en agua milliQ a 4°C. **B.-** Espectro de dicroísmo circular obtenido de una solución de p31-43 a 200 µM y diferentes temperaturas (●) 4 °C, (■) 10 °C, (▲) 25 °C and (▼) 37 °C. **C.-** Diferencia punto a punto entre las temperaturas limites 37°C y 4°C de espectros de una solución de p31-43 a 200 µM

#### 4.1.1.1. Evaluación de equilibrio conformacional de p31-43 por dicroísmo circular

Para complementar los estudios anteriores, evaluó el comportamiento de soluciones de p31-43 en presencia del agente caotrópico urea (que permite confirmar la estructura

secundaria predominante) y del cosolvente TFE (que permite evaluar si la estructura helicoidal PPII, se encuentra en equilibrio con otras conformaciones).

Como se mencionó previamente la estructura secundaria tipo poliprolina II es una hélice levógira, que posee tres residuos por vuelta, y no posee puentes de hidrógeno intracatenarios (Shewry y Tatham 1997). Es por esto que esta conformación no se ve afectada por agentes caotrópicos, como la urea 8M (Lopes et al. 2014). En los experimentos realizados se utilizaron soluciones de péptido a 50  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ , como concentraciones representativas del sistema, que fueron tratadas con urea 8M a 25 °C. Se observó una banda positiva a 225nm a ambas concentraciones, característica de la presencia de una estructura secundaria tipo poliprolina II (Gilbert et al. 2000). Lo cual, confirmó la presencia de este tipo de conformación en condiciones desnaturalizantes a temperatura ambiente (Figura 36 A).

Por otro lado, para evaluar si la estructura helicoidal PPII se encontraba en equilibrio con otras conformaciones se utilizó TFE, de modo de favorecer la formación de enlaces intramoleculares (Roccatano et al. 2002). Se analizaron por DC soluciones de p31-43 a 200  $\mu\text{M}$ , a una temperatura constante de 4°C, y un rango creciente de concentraciones de TFE 0, 10, 20, 30, 50 %v/v.

En los espectros se observó que a medida que la concentración de TFE se incrementaba se producía un desplazamiento hipocrómico (disminución de la intensidad) de la banda negativa desde -11.000 a -6000, y un desplazamiento hacia el rojo (la banda se desplaza hacia longitudes mayores de onda) desde 203 nm hacia 204 nm (Figura 36 B). Esto nos sugirió que la estructura de p31-43 variaba y que existía un equilibrio con otras estructuras secundarias. A 50 %v/v de TFE se observó una banda positiva a 195nm y un cambio en el rojo a 208nm, lo que nos sugirió que el péptido estaba en equilibrio con

estructuras del tipo  $\beta$  (Bochicchio y Tamburro 2002). Estos resultados indican que el péptido es capaz de modificar su conformación de acuerdo con su entorno.

#### 4.1.2. Caracterización de oligómeros de p31-43 en solución mediante sonda fluorescente BODIPY y dispersión dinámica de la luz (DLS)

Se realizó un ensayo fluorométrico utilizando la sonda BODIPY, la cual se une a oligómeros solubles de péptidos y cambia su comportamiento espectroscópico. Cuando esta sonda es excitada a 525nm y se encuentra unida en solución a oligómeros y fibrillas, su fluorescencia se incrementa comparada con la fluorescencia de una solución control (Smith et al. 2010). En estos ensayos utilizamos soluciones de p31-43, a diferentes concentraciones dentro del rango evaluado por DC (10, 50, 100 $\mu$ M), que se incubaron con BODIPY. Se observó un incremento en la señal de fluorescencia lo que sugirió que la sonda se unió a oligómeros de p31-43.

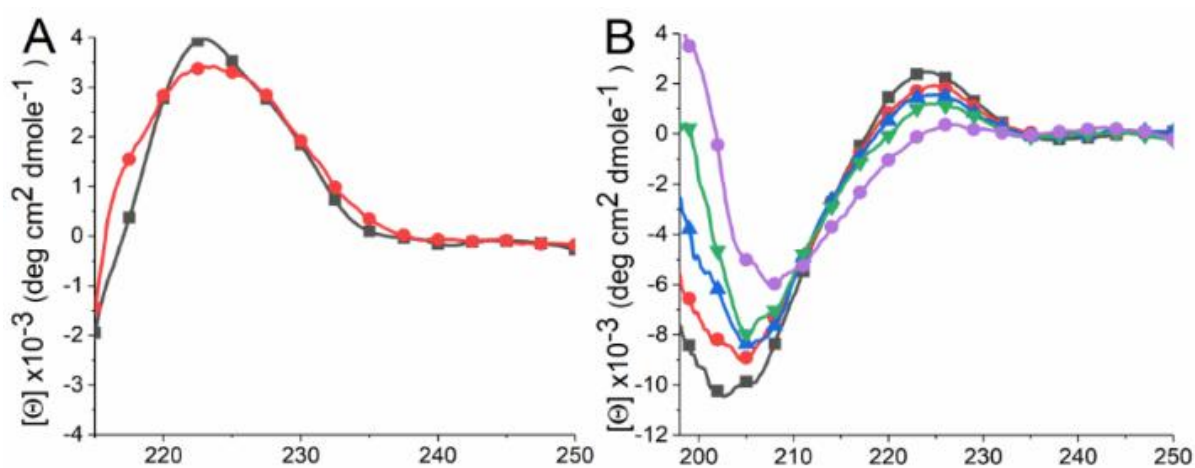


FIGURA 36. DICROÍSMO CIRCULAR DEL PÉPTIDO DE P31-43 OBTENIDO EN PRESENCIA DE UREA Y TFE

**A.**-Espectro obtenido a (●) 50  $\mu$ M y (■) 200  $\mu$ M en urea 8M a 25°C. **B.**-Espectro de una solución de p31.43 a 200  $\mu$ M a diferentes concentraciones de TFE: (■) 0%, (●) 10 %, (▲) 20% and (▼) 30% y (●) 50% V/V, a 4°C.

De estos resultados se pudo inferir la existencia de un proceso de agregación, en el que, a mayor concentración, se observaron mayor cantidad de oligómeros de p31-43 en solución (Figura 37 A).

Por otro lado, para complementar estos estudios y evaluar el comportamiento de p31-43 en solución se realizó un análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), esta técnica se basa en la utilización de un láser que incide sobre una solución con partículas durante un tiempo determinado, la luz incidente es dispersada por las distintas partículas en solución y se puede medir el coeficiente de difusión ( $D_t$ ) de las macromoléculas en solución. El  $D_t$  se relaciona con la facilidad de una partícula para difundir sobre otra y es inversamente proporcional al tamaño de la partícula. A partir del  $D_t$  se puede calcular el tamaño del radio hidrodinámico de la partícula. La técnica de DLS es extremadamente sensible a la presencia de agregados (Bishop, Martin, y Rosenblum 1991) y sus resultados

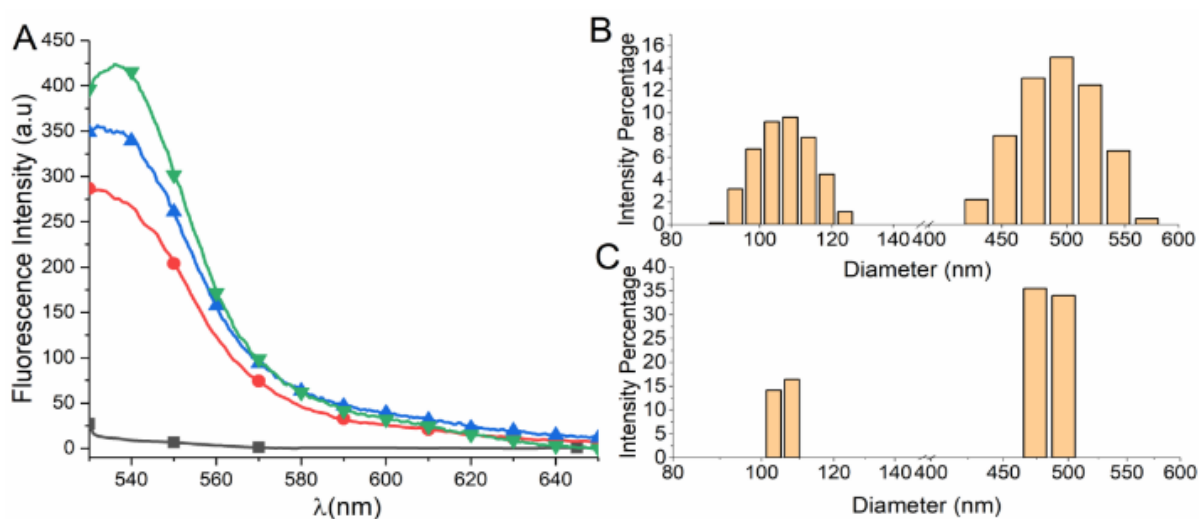


FIGURA 37. CARACTERIZACIÓN DE OLIGÓMEROS DE P31-43 EN SOLUCIÓN MEDIANTE SONDA FLUORESCENTE BODIPY Y DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

**A.**-Espectro de emisión de fluorescencia de la sonda BODIPY, en presencia de soluciones de p31-43 a diferentes concentraciones: (●) 10, (▲) 50 and (▼) 100  $\mu$ M. Se utilizó como control agua milliQ con sonda (1 $\mu$ M) (■). La longitud de onda de excitación fue de 525 nm. La distribución de diámetro hidrodinámico de las soluciones de p31-43 se obtuvo mediante dispersión dinámica de la luz DLS. **B.**- a 125  $\mu$ M y **C.**- a 75  $\mu$ M concentración final de péptido, en soluciones preparadas con agua MilliQ. Las muestras fueron previamente centrifugadas y filtradas para eliminar partículas o grandes agregados.

pueden expresarse como % Intensidad en función del diámetro hidrodinámico de las partículas. En estos ensayos, se evaluaron dos concentraciones de p31-43, 125  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ . Se seleccionaron estas concentraciones ya que, a menores concentraciones, las muestras carecían de la dispersión suficiente y no podían ser analizadas. Se observó que ambas soluciones presentaron polidispersidad, lo que sugirió la presencia de diferentes poblaciones. A 125  $\mu\text{M}$  se observaron dos poblaciones predominantes, que poseían un diámetro hidrodinámico medio de  $107 \pm 7$  nm y otra con grandes agregados con un diámetro hidrodinámico medio de  $493 \pm 31$  nm (Figura 37 B). Cuando se analizó la solución de p31-43 a 75  $\mu\text{M}$  que fue obtenida a partir de una dilución en agua milliQ de la solución a 125  $\mu\text{M}$ , se observó una distribución de poblaciones similar a la solución de mayor concentración. Algunas de las partículas detectadas poseían un diámetro hidrodinámico medio de  $106 \pm 2$  nm y otras  $484 \pm 11$  nm. (Figura 37 C). En conclusión, estos ensayos demuestran que p31-43 forma oligómeros de diferentes diámetros hidrodinámicos en solución.

#### *4.1.3. Análisis de nanoestructuras de p31-43 mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM)*

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica adecuada para el estudio de la morfología de oligómeros y agregados proteicos (Anderson y Webb 2011; Hernández et al. 2005; Miranda et al. 2005). Posee una resolución de 50 pm y se pueden obtener imágenes con una magnificación de hasta  $1 \times 10^7$  X (Erni et al. 2009). En TEM se utiliza un haz de electrones acelerado típicamente a más de 100 kV, que se enfoca utilizando fuerzas electroestáticas y electromagnéticas e incide sobre la muestra que se encuentra depositada en una grilla de cobre, el haz de electrones puede ser dispersado o transmitido a través de la muestra (Ruska 2005). Las imágenes que se obtienen por TEM

poseen un único valor de brillo por pixel, lo que se traduce en una imagen global en la escala de grises. Las muestras de tejidos o soluciones biológicas necesitan marcación de alto contraste o tinción negativa para poder ser analizadas, en este tipo de procedimiento se marcará el fondo de la imagen para dejar la muestra visible.

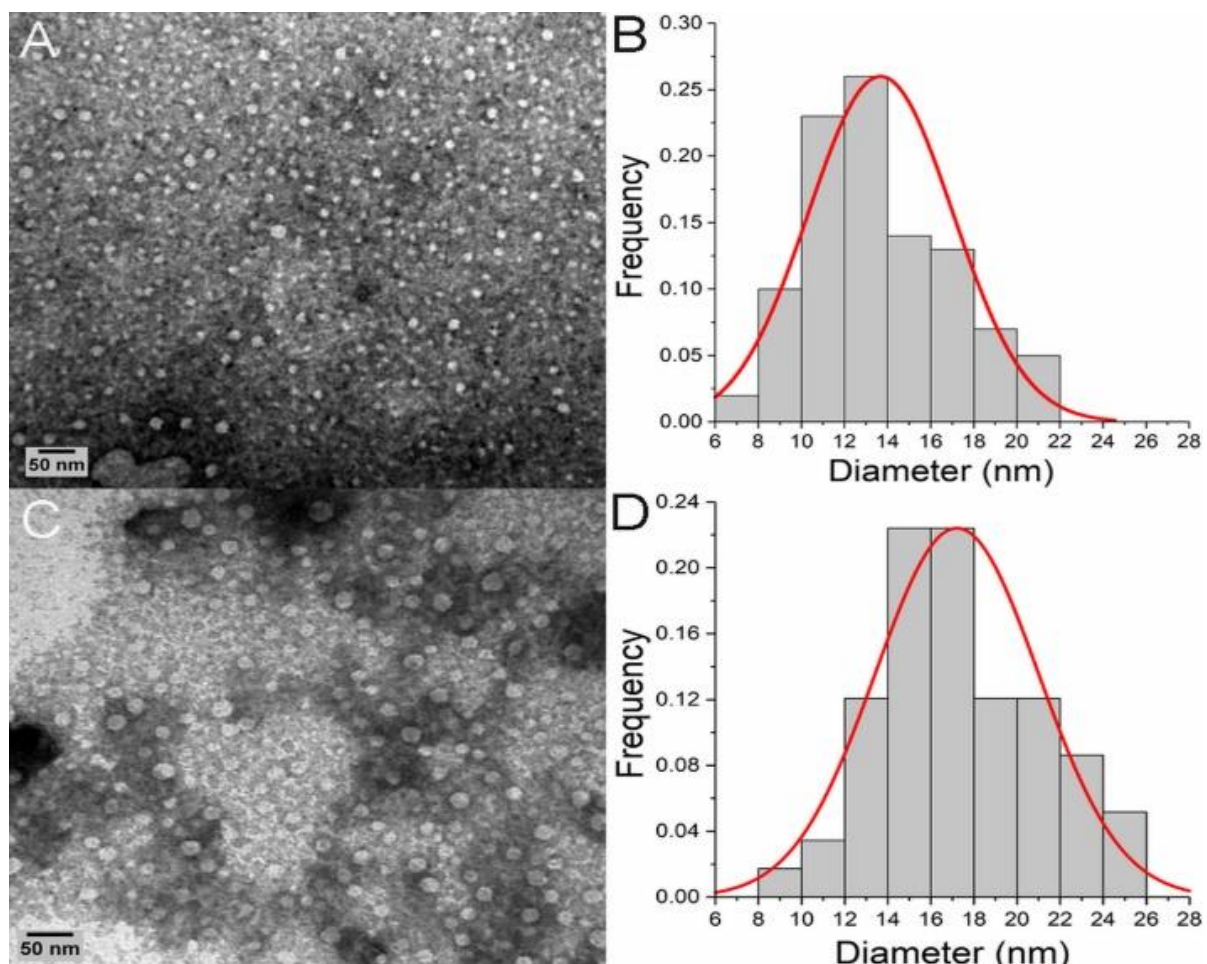


FIGURA 38. CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS OLIGOMÉRICAS DE P31-43 POR TEM  
**A.-** Imagen representativa de una solución 50  $\mu\text{M}$  de p31-43 en la que se pueden evidenciar los oligómeros esféricos de color blanco contrastando con el fondo oscuro de la grilla. **B.-** Frecuencia de distribución de diámetros de oligómeros observados a 50  $\mu\text{M}$ . **C.-** Imagen representativa de una solución de p31-43 a 100  $\mu\text{M}$ , en la que se observan oligómeros de un mayor diámetro. **D.-** Frecuencia de distribución de diámetros de los oligómeros formados a 100  $\mu\text{M}$ .

En el caso de TEM la opacidad a los electrones estará dada por el número atómico. Algunos colorantes habituales incluyen uranil acetato; uranil formato, tetróxido de osmio

y oro. Estos se utilizan porque pueden dispersar electrones fuertemente y se adhieren bien a las matrices biológicas. La marcación negativa es un muy buen método para observar virus, bacterias, matrices biológicas y agregados proteicos ya que estos tienen una muy baja capacidad de dispersar electrones (Hayat 2000; Bozzola y Russell 1999).

Para estudiar las características de p31-43 utilizando TEM, se utilizaron soluciones de p31-43 a 50  $\mu\text{M}$  y a 100  $\mu\text{M}$  preparadas en agua milliQ. En la Figura 38 A se puede observar que a 50  $\mu\text{M}$  el péptido formó gran cantidad de oligómeros esféricos distribuidos al azar en el campo. Estos oligómeros tenían un diámetro promedio de  $14 \pm 3$  nm (Figura 38 B). Al incrementarse la concentración a 100  $\mu\text{M}$  se observaron oligómeros de mayor diámetro, alrededor de  $17 \pm 7$  nm (Figura 38 C y D). Estos resultados demuestran que el péptido p31-43 puede formar oligómeros estables cuyo tamaño parece incrementarse con la concentración.

#### *4.1.4. Análisis de formación de oligómeros de p31-43 por microscopía de fuerza atómica (AFM)*

Decidimos realizar un análisis por microscopía de fuerza atómica (AFM) de p31-43 para complementar el estudio estructural y obtener imágenes con mayor resolución en muestras no fijadas ni tratadas con solventes que pudiesen generar artefactos, lo que presentó una importante ventaja comparado con TEM (Last et al. 2010). Mediante AFM se pudieron obtener imágenes topográficas de muestras de p31-43 que posibilitaron observar procesos de agregación del péptido (Dufrêne et al. 2017; Baclayon, Roos, y Wuite 2010; Lu, Zhang, y Pang 2005).

En AFM se utiliza una punta (denominada cantilever) que recorre la superficie de una muestra depositada en una superficie sólida y lisa (como MICA) y va generando un mapa topográfico de la muestra. El cantiléver detecta las fuerzas capilares electrostáticas, de



Van Der Waals y friccionales que se establecen con la muestra. Un scanner mueve la punta respecto a la superficie y el transductor de fuerza detecta el cambio de fuerzas que se establecen entre la punta y la muestra a medida que se recorre la muestra (Eaton y West 2010).

En los ensayos realizados por AFM se utilizaron soluciones de p31-43 en agua MilliQ (para evitar posibles artefactos producidos por sales de buffers como PBS) a diferentes concentraciones 5, 50, 100  $\mu\text{M}$  que se depositaron sobre una superficie lisa de MICA.

En las imágenes de AFM a 5  $\mu\text{M}$ , se observaron oligómeros esféricos distribuidos al azar sobre la superficie de MICA (figura 39 A). Estos oligómeros poseían diferentes alturas como se muestra en la figura 39 B. El análisis de la frecuencia de distribución de alturas de los oligómeros mostró una mayor proporción de altura media de  $3 \pm 2$  nm (figura 39 C) y una menor proporción de oligómeros de alturas mayores. En la figura 39 D se pueden observar alturas de tres oligómeros representativos (1,2nm, 2,25nm y 3,25nm) escogidos al azar, de la figura 39 B.

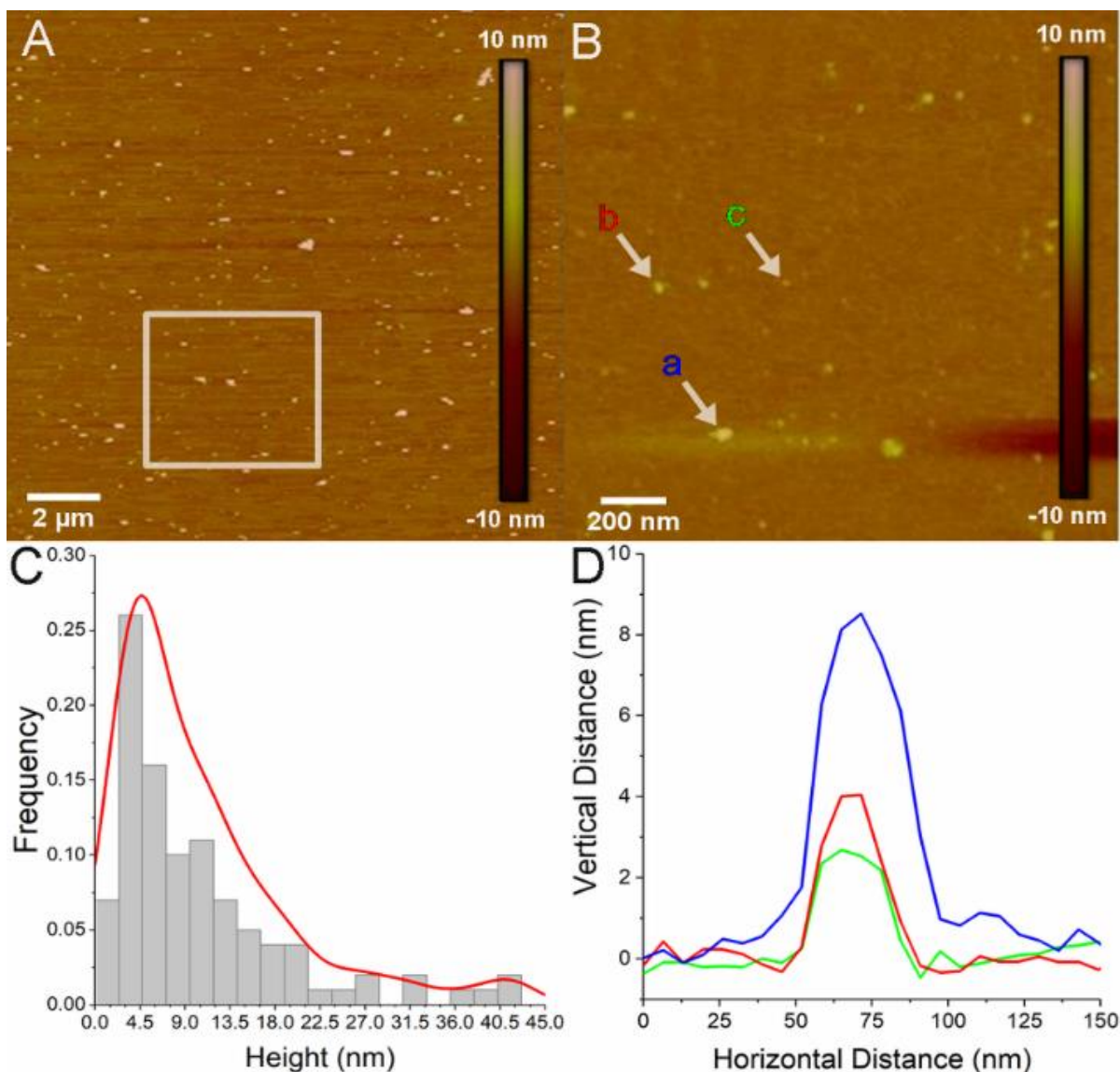


FIGURA 39. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 A 5  $\mu$ M POR AFM

Se utilizó una solución de péptido en agua MilliQ, depositada sobre superficie de MICA. **A.-** Imagen de AFM obtenida en modo tapping ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ). **B.-** Zoom de la sección marcada con un cuadrado en la imagen A. Se utilizó un modo tapping topográfico ( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ ). Las estructuras que se observaron se representan con flechas blancas y se presentan dependiendo de su tamaño como oligómeros pequeños (**a**), intermedio (**b**) y grandes (**c**). **C.-** Distribución de alturas obtenidas de la imagen A, se analizaron 50 partículas como mínimo y se midió su altura. **D.-** Análisis de secciones de corte de las partículas (**a**, **b**, **c**) presentadas en la imagen B.

Cuando se analizaron soluciones de p31-43 a 50  $\mu$ M, una concentración 10 veces mayor, se observó una población heterogénea de oligómeros (Figura 40 A y B), que coexiste en equilibrio entre ellas. El análisis de la frecuencia de distribución de alturas de

los oligómeros mostró una mayor proporción de alturas media de  $5 \pm 3$  nm (Figura 40 C y D).

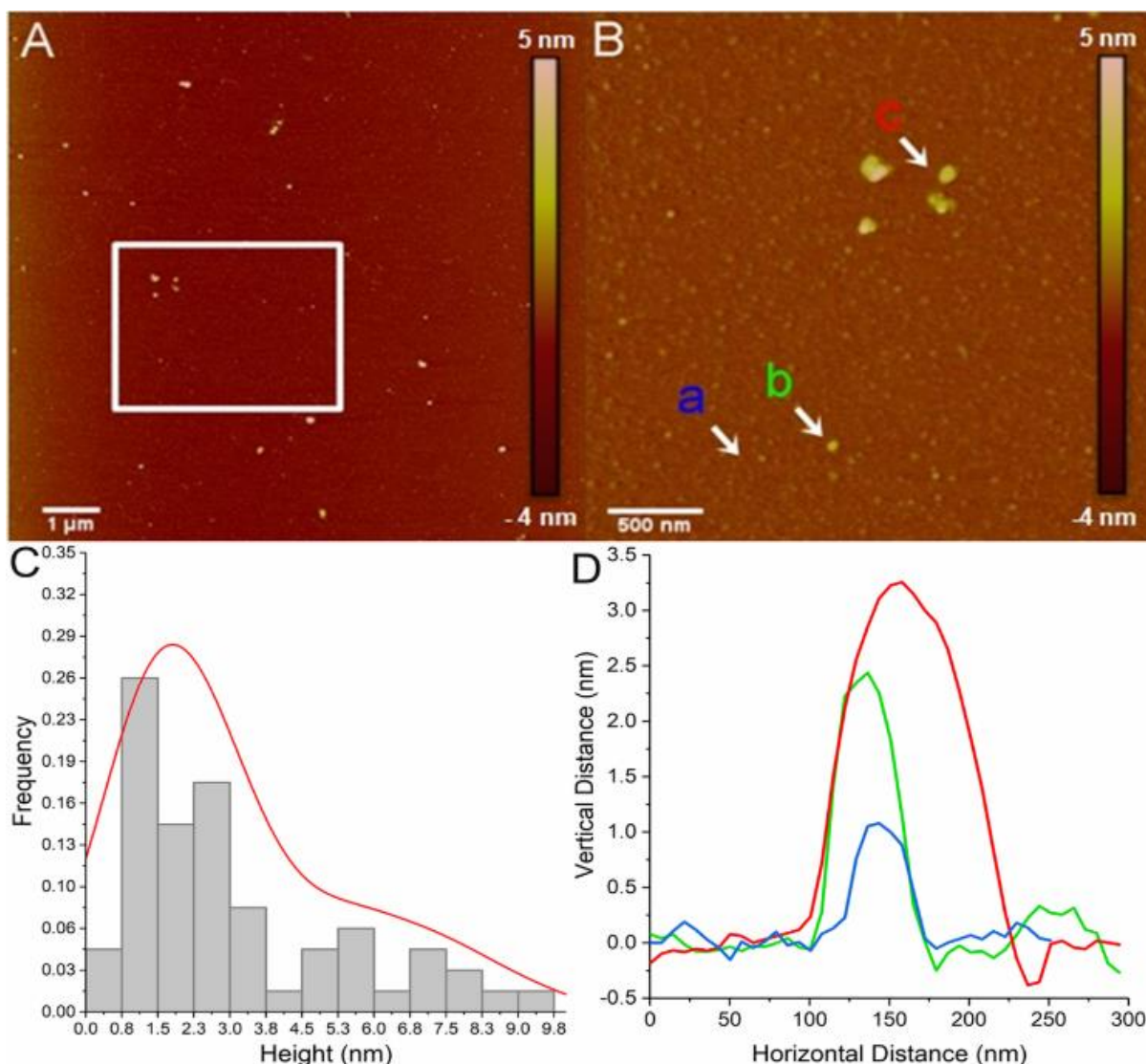


FIGURA 40. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA POR AFM DE P31-43 A 50 μM

**A.-** Imagen de AFM obtenida en modo tapping ( $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ ). **(B)** Zoom de la sección marcada en la imagen A, en la que se pueden observar diferentes oligómeros, que se presentan dependiendo de su tamaño, como oligómeros pequeños (a), intermedio (b) y grandes (c). **C.-** Distribución de alturas obtenidas de la imagen A, se analizaron 100 partículas como mínimo y se midió su altura. **D.-** Análisis de secciones de corte de las partículas (a, b, c) presentadas en la imagen B.

Finalmente utilizando una solución 100 μM de p31-43, se observó que el péptido se agregó en oligómeros amorfos de gran tamaño, 250nm de largo, 100-140nm de ancho

y aproximadamente 5 nm de alto, que coexistieron en equilibrio con otros de tamaños menores (Figura 41 A y B).

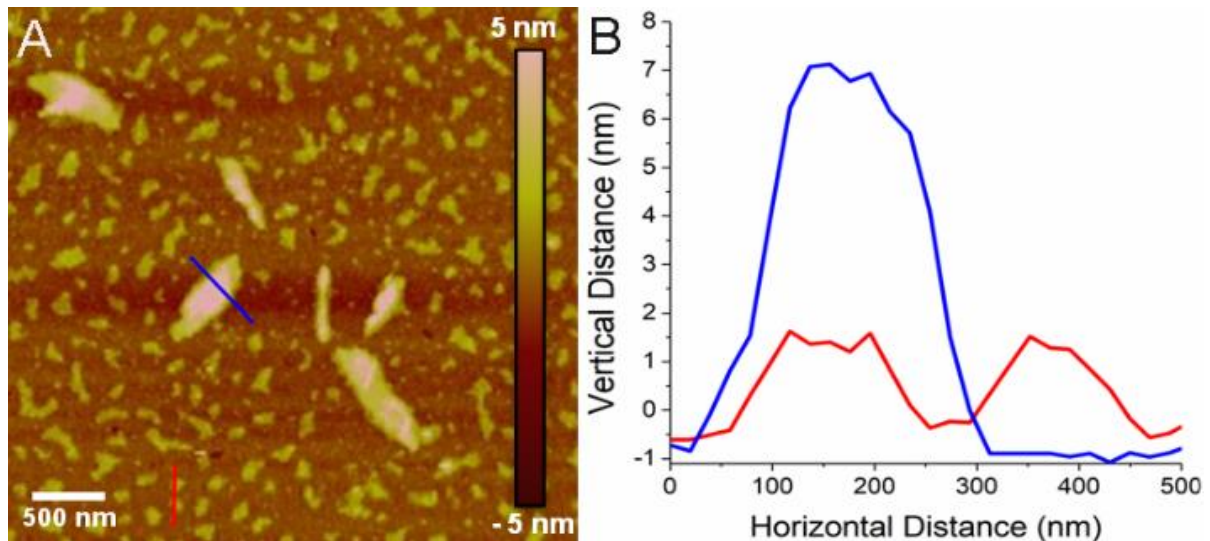


FIGURA 41. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL PÉPTIDO DE GLIADINAS P31-43 A 100  $\mu$ M POR AFM

**A.**-Imagen de AFM obtenida en modo tapping ( $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ ). **B.**- Análisis de secciones de corte de las partículas (a, b) presentadas en la imagen A.

#### 4.1.5. Análisis de cinética de agregación de oligómeros de p31-43 mediante AFM

Los resultados de DC y AFM indicaron que p31-43 formaba oligómeros con capacidad de agregarse, así como también, evidenciaron que este proceso es dependiente de la concentración. En este caso, debido a que los procesos de agregación y oligomerización proteicos son altamente dependientes de factores como el tiempo, la temperatura y la concentración (Jayaraman et al. 2011), nos interesó realizar un estudio en el tiempo (0 a 14 días) de dos soluciones de p31-43 preparadas en agua MilliQ a las concentraciones de 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M. Las muestras se incubaron a 4°C para reducir la velocidad del proceso de agregación en curso y preservar las etapas tempranas del

mismo. A concentraciones mayores ( $100 \mu\text{M}$ ) observamos la formación de agregados extremadamente grandes que no permitieron su estudio por AFM.

En la Figura 42, se pueden observar imágenes representativas de la cinética de agregación de p31-43 a  $10 \mu\text{M}$  y de la frecuencia de distribución de alturas de las partículas. Se observó que la solución de p31-43 preparada fresca (día 0) y depositada sobre una placa de MICA, presentó tres poblaciones de oligómeros distribuidos al azar. Los pequeños poseían una altura media de  $2,6 \pm 0,5 \text{ nm}$ , los medianos de  $4,7 \pm 0,9 \text{ nm}$  y oligómeros mayores de  $6,3 \pm 0,7 \text{ nm}$ . En la imagen se puede observar que tanto los oligómeros pequeños, como los medianos se encuentran más representados en todo el campo (Figura 42 A). Las muestras que fueron incubadas durante 4 días a  $4^\circ\text{C}$ , presentaron oligómeros que se agregaron para generar estructuras mayores con alturas medias de  $5,5 \pm 0,9$  (Figura 42 B). Esto puede deberse a que se formaron a partir de oligómeros de mayor tamaño que se encontraban formando grupos. En las muestras incubadas por 7 días se detectaron menos oligómeros, de altura media de  $22 \pm 8 \text{ nm}$  (figura 42 C). Finalmente, en muestras incubadas durante 14 días se pudieron detectar pocos (menos del 5%) oligómeros mayores de altura media ( $52 \pm 8 \text{ nm}$ ); Sin embargo, la mayoría de las moléculas poseían alturas entre  $18 \pm 3 \text{ nm}$  y  $5 \pm 3 \text{ nm}$  (Figura 42 D). En conclusion, el análisis en el tiempo de soluciones de p31-43 a  $10 \mu\text{M}$  presentó oligómeros esféricos que se podrían haber continuado agregando hasta generar oligómeros esféricos mayores.

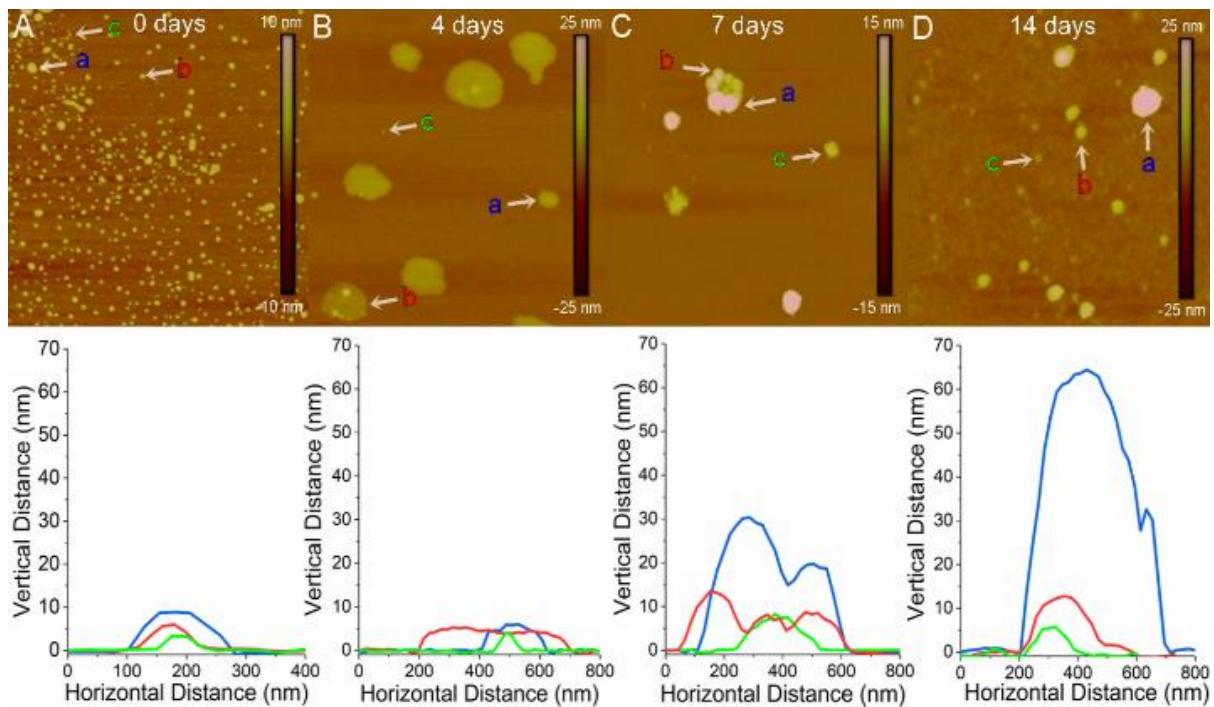


FIGURA 42. CINÉTICA DE AGREGACIÓN DE P31-43 A  $10 \mu\text{M}$

Las soluciones de péptido fueron preparadas en agua milliQ. Las muestras se depositaron sobre superficie de MICA, y las imágenes de AFM se adquirieron en modo “tapping” ( $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ ). En el **panel superior** se observan imágenes representativas de AFM **A.-** día 0, **B.-** día 4, **C.-** día 7 y **D.-** día 14. En el **panel inferior**, se observa la distribución de alturas de tres oligómeros elegidos al azar por cada imagen para los distintos tiempos, día 0, día 4, día 7 y día 14.

Cuando el proceso de agregación se analizó a  $50 \mu\text{M}$ , las estructuras observadas fueron diferentes a las detectadas a  $10 \mu\text{M}$ . En la muestra preparada fresca (día 0) se detectaron tanto oligómeros pequeños de altura media de  $4 \pm 1 \text{ nm}$ , como grandes con una altura media de alrededor  $50 \text{ nm}$  (Figura 43 A), también se pudieron observar oligómeros intermedios que sugieren que, de forma análoga al proceso anterior, los oligómeros interaccionan entre sí. Luego de la incubación de las muestras por 4 días a  $4^\circ\text{C}$ , los oligómeros aislados se organizaron en una estructura macromolecular amorfa, que contenía oligómeros pequeños de altura media de  $8 \pm 4 \text{ nm}$  y oligómeros más grandes de altura media de  $21 \pm 5 \text{ nm}$ . (Figura 43 B). Siete días post incubación de la solución de p31-43 a  $4^\circ\text{C}$ , se observó que la mayoría de las estructuras presentaron una altura media de  $14 \pm 6 \text{ nm}$ , y una menor proporción fueron oligómeros grandes de una altura media

de  $40 \pm 6$  nm. Además, se observó que los oligómeros se asociaron generando pequeñas estructuras lineales (Figura 43 C). Finalmente, luego de la incubación por 14 días, se evidenció la presencia de estructuras lineales ramificadas con distribución periódica. Estas ramas poseían regiones con alturas medias de  $20 \pm 7$  nm y otras de mayor altura de  $48 \pm 10$  nm (Figura 43 D).

Además, se pudieron detectar algunos agregados con una altura de  $114 \pm 15$  nm. Es interesante mencionar que se observó mayor cobertura de la superficie a tiempos mayores de incubación. Esta organización fractal fue detectada previamente en péptidos como el 33-mer derivado de  $\alpha$ -gliadina (Herrera et al. 2015).

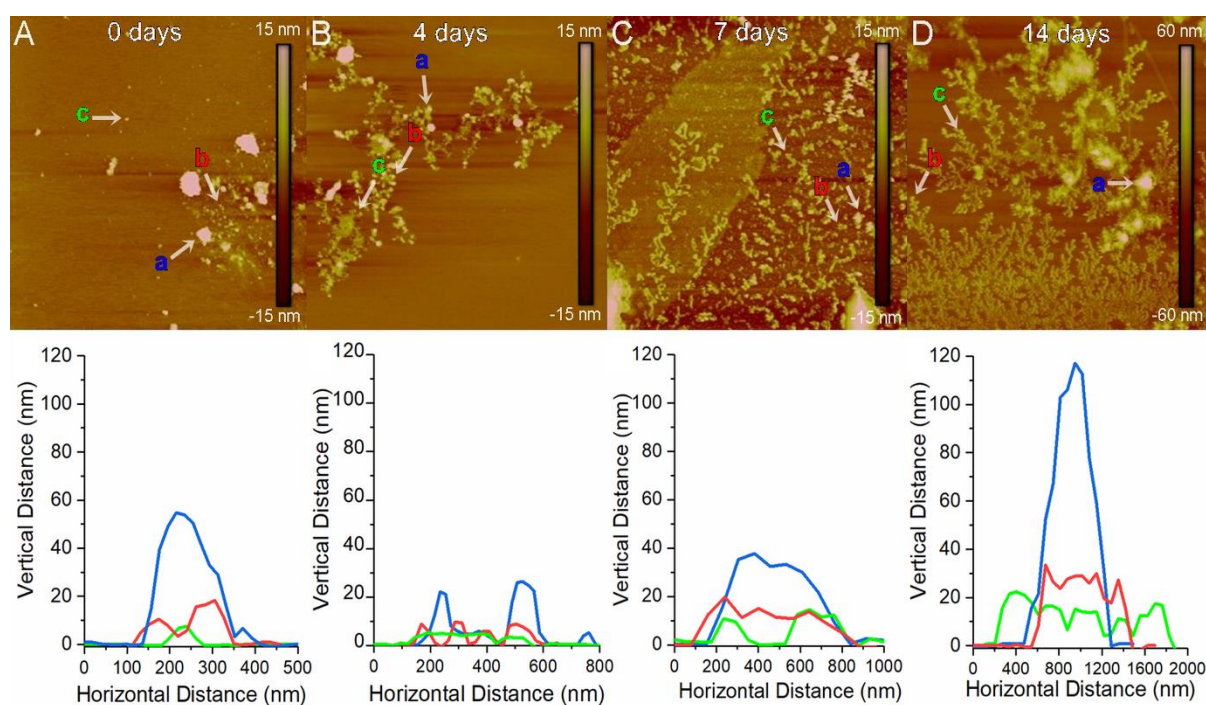


FIGURA 43. CINÉTICA DE AGREGACIÓN DE P31-43 A  $50 \mu\text{M}$

Las soluciones de péptido fueron preparadas en agua milliQ, las muestras se depositaron sobre superficie e MICA, y las imágenes de AFM se adquirieron en modo tapping ( $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ ). En el **panel superior** se observan imágenes representativas de AFM al **A.-** día 0, **B.-** día 4, **C.-** día 7 y **D.-** día 14. En el **panel inferior**, se observa la distribución de alturas de tres oligómeros elegidos al azar por cada imagen para los distintos tiempos, día 0, día 4, día 7 y día 14. Se analizó la distribución de alturas en 100 partículas por imagen, en cada condición.

#### *4.1.6. Modelado in silico de p31-43*

En colaboración con el grupo del Dr. Sergio Pantano del Instituto Pasteur Montevideo, Uruguay, se realizó un estudio de modelado molecular, para analizar determinantes estructurales relevantes en el proceso de agregación del péptido p31-43.

Como primera aproximación se utilizó una única copia del péptido sobre la que se asumió una conformación helicoidal. Luego de realizar la simulación computacional se observó que esta estructura era altamente flexible pudiendo adquirir conformaciones al azar en sus extremos, mientras que su centro se mantenía firme con una conformación helicoidal (Figura 44 A).

Por otro lado, utilizando 4 conformeros de p31-43 (obtenidos a lo largo de la simulación del péptido individual), se realizó una simulación molecular de 5  $\mu$ s con un set de 50 copias de estas cuatro conformaciones de péptidos individuales, presentados en la figura 44 B. Cuando las múltiples copias de p31-43 se simularon juntas, se observó un proceso de agregación espontánea, vía formación de pequeños agregados proteicos que eventualmente se fusionaron en un único agregado. Estos agregados tuvieron diámetros medios, mayores y menores de  $10,1 \pm 0,2$  nm y  $6,9 \pm 0,1$  nm, respectivamente. Estos tamaños fueron comparables con los observados previamente en oligómeros pequeños, mediante ensayos por TEM y AFM. La variación del tamaño medio del agregado (MCS) sugiere que existen eventos espontáneos de disociación en la solución. Se puede observar que el tamaño de los péptidos osciló durante las etapas iniciales de la simulación, hasta que se estabilizó en 2,4  $\mu$ s (Figura 44 C-E).



Al final de la simulación, se realizó una superposición de los conformeros de p31-43 a los 5 $\mu$ s (Figura 44 D), observándose que a diferencia del péptido aislado las copias multiméricas de p31-43 mostraban un incremento en la proporción de estructura secundaria poliprolina II en comparación con los monómeros.

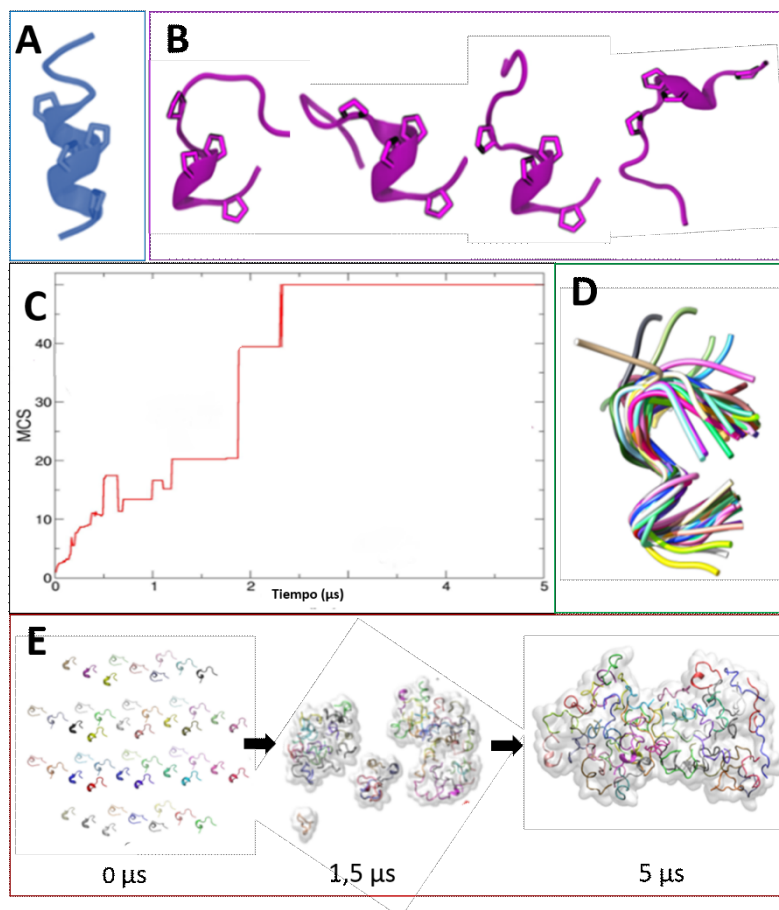


FIGURA 44. MODELADO MOLECULAR Y SIMULACIÓN DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE P31-43

**A.-** Se muestra la representación de la conformación inicial helicoidal del péptido que se utilizó en la simulación *in silico*. Para claridad visual solo se mostraron los residuos de prolina. **B.-** Se muestran cuatro conformeros diferentes elegidos al azar mientras se realizaba la simulación del péptido aislado, que se utilizaron como configuración inicial de la simulación de agregación. **C.-** Se observa el tamaño medio del agregado (MCS) en función del tiempo, en la simulación de agregación. **D.-** Se presenta una estructura en la que se superpusieron varias copias de péptidos individuales obtenidos al final de la simulación, para resaltar la convergencia estructural dentro del agregado. **E.-** La simulación computacional consistió en utilizar a tiempo 0  $\mu$ s, 50 copias de p31-43 en conformación individual, a cada péptido individual se le asignó un color diferente. A 1,5  $\mu$ s se puede observar un estado intermedio del agregado, mientras que a 5  $\mu$ s se presenta la conformación final del péptido.

Además del estudio *in silico* de agregación, se realizó un segundo análisis estructural por aminoácidos evaluando las conformaciones monoméricas y oligoméricas. Se identificó un segmento, en la porción central del péptido, que podría explicar los fenómenos observados en los experimentos por DC (Figura 45 A y B). A medida que la simulación progresó y se formó el oligómero, se observó un incremento del 28% de la conformación tipo poliprolina II en los residuos PRO<sub>8</sub> y PRO<sub>9</sub>, mientras que los aminoácidos externos experimentaron un incremento en conformaciones beta. Estas se estabilizaron mediante formación de estructuras tipo hojas  $\beta$  con otros péptidos del oligómero.

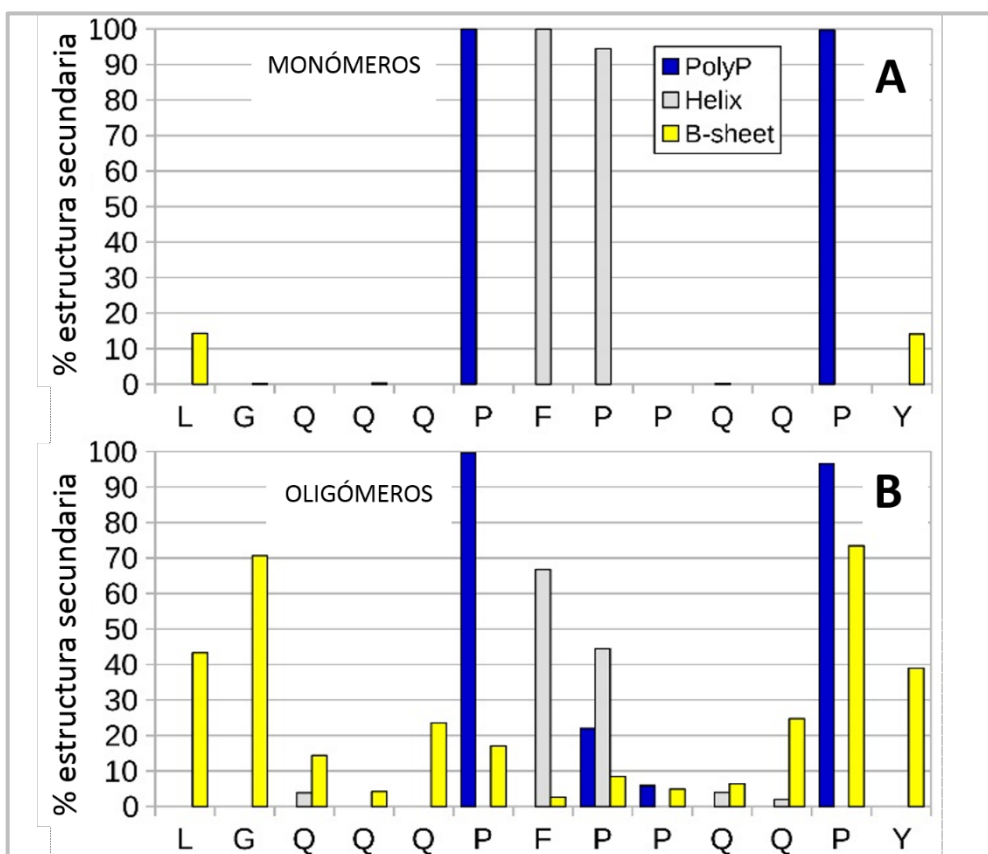


FIGURA 45. SIMULACIÓN DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE P31-43  
 Promedio de la estructura secundaria por aminoácido de p31-43 para **A.**- monómeros u **B.**- oligómeros. El contenido de estructuras tipo beta extendida, poliprolina II y hélices se muestran en Amarillo, azul y gris, respectivamente.

#### 4.1.7. Efectos de variaciones de pH en agregados de p31-43

Por otro lado, analizamos el efecto de variaciones de pH sobre el oligómero. Para esto, se evaluaron por DC soluciones de p31-43 a diferentes pHs (3,0; 5,0; 7,4 y 8,0), a dos temperaturas, 4°C y 37°C. Se observó, que la estructura secundaria del agregado no varió con el pH, a ninguna de las temperaturas evaluadas (Figura 46 A y B).

Este resultado es relevante ya que nos da indicios de que los agregados de p31-43 podrían mantenerse estables durante la digestión estomacal (pH 2-3) y durante el pasaje al lumen intestinal (pH 7-8), tanto a temperaturas bajas donde predomina la estructura tipo poliprolina II, como a temperatura fisiológica.

Es importante resaltar que los únicos residuos protonables dentro de la cadena de aminoácidos de p31-43, en el rango de pH explorado, corresponden al carboxilo C-terminal. Tomando en cuenta los resultados de la simulación *in silico* de monómeros de p31-43, sabemos que existe una estrecha interacción entre los extremos -amino y -carboxil dentro de la estructura del péptido, en donde la proximidad de la carga positiva de -NH<sub>3</sub> podría estabilizar al carboxilo. Lo que permitiría explicar la estabilidad, frente al cambio de pH, de los agregados de p31-43.

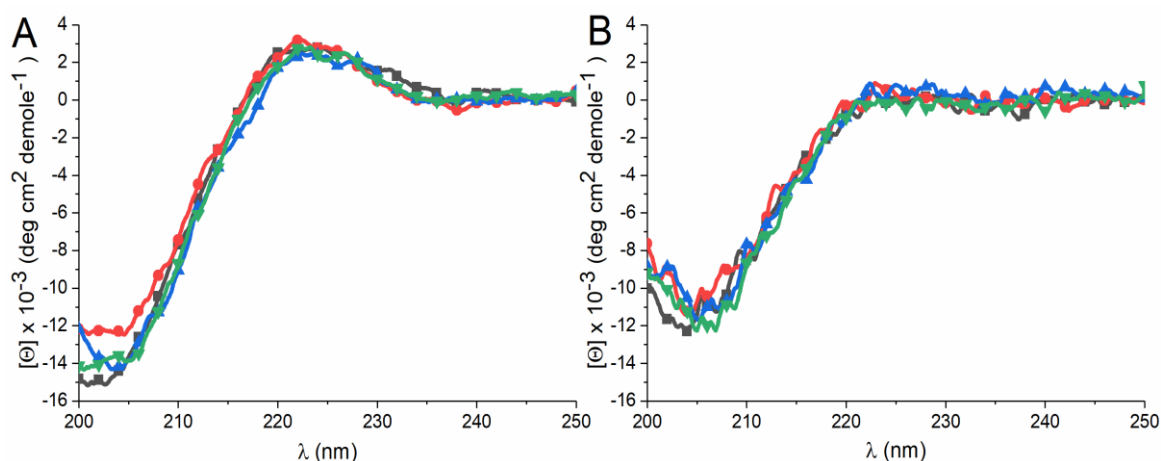


FIGURA 46. DICROÍSMO CIRCULAR DE SOLUCIONES DE P31-43 A DISTINTOS PHs

Se analizaron soluciones de p31-43 en buffer fosfato evaluando un rango de pHs: 3,0 (■), 5,0 (●), 7,4 (▲) y 8,0 (▼). Se presentan los espectros obtenidos A.- a 4°C y B.- 37°C

## 4.2. Sección II: Vías de señalización involucradas en el daño intestinal inducido por p31-43 *in vivo*

En estudios previos hemos mostrado que el efecto de daño a la mucosa intestinal de p31-43 requiere la vía de MyD88. Empleando ratones C3H-HeJ (deficiente en la señalización de TLR4), mostramos que este efecto 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). Además, se evidenció que p31-43 indujo mediadores proinflamatorios como IFN  $\beta$  e IFN  $\gamma$ . Teniendo en cuenta que p31-43 produce efectos a tiempos muy cortos luego de la administración *in vivo* y que no se ha encontrado el receptor de este péptido (Paoletta et al. 2018), nos interesó evaluar otras vías de señalización implicadas en el daño observado. Considerando los datos estructurales descritos en la sección anterior, estudiamos si oligómeros de p31-43 podían inducir la activación del inflammasoma, en particular el formado por NLRP3. Este inflammasoma, es considerado un sensor de estructuras morfológicamente diversas como ser asbestos, silica, o señales de daño de vesículas, RE o mitocondrias (Re 2011; Gómez, Urcuqui-Inchima, y Hernandez 2017).

### 4.2.1. *Análisis de la implicancia del inflammasoma NLRP3 en la enteropatía inducida por oligómeros de p31-43*

Con el objetivo de analizar la participación del inflammasoma NLRP3 utilizamos animales NLRP3<sup>-/-</sup> y Caspasa-1<sup>-/-</sup> a los que se les administró por vía intragástrica p31-43 o PBS. Se observó que luego de 16 hs post tratamiento estos ratones no desarrollaron enteropatía (Figura 47). En base a estos resultados se pudo inferir que NLRP3 y Caspasa-1, son moléculas necesarias en la inducción de daño causado por p31-43.

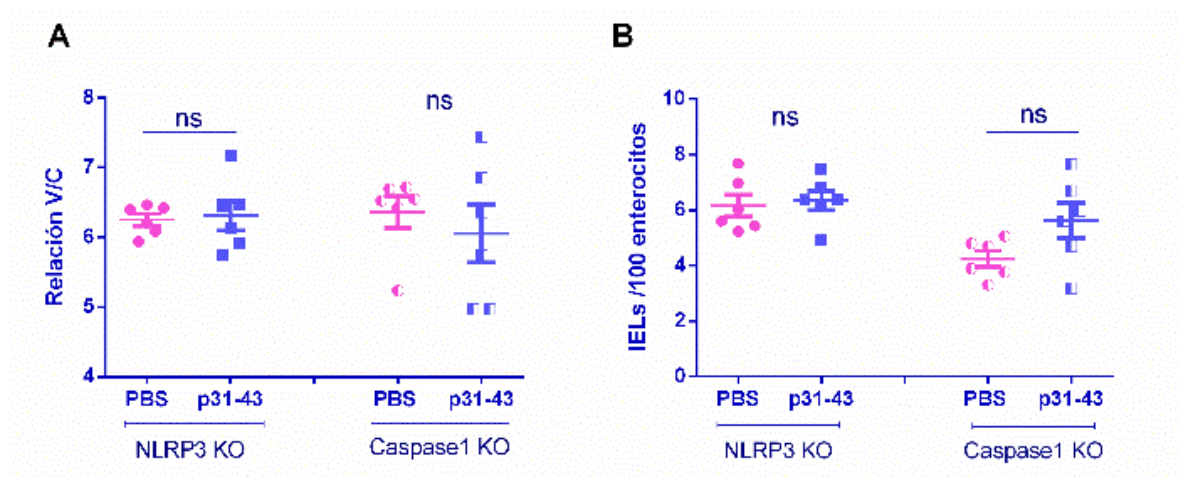


FIGURA 47. LA ENTEROPATÍA INDUCIDA POR p31-43 REQUIERE DE NLRP3 Y DE CASPASA-1

Análisis morfológico de intestino delgado proximal de ratones *NLRP3*<sup>-/-</sup> y de Caspasa 1 <sup>-/-</sup> luego de 16 horas post administración de 20 µg/ratón de p31-43 o PBS. **A.**- relación V/C **B.**- Número de IELs cada 100 enterocitos, evaluados en 10 puntas de vellosidades elegidas al azar. N=6 ratones por grupo. Test T-Student.

En este capítulo, se realizó la primera caracterización estructural de p31-43. El mismo presenta una estructura secundaria mayoritariamente del tipo poliprolina II en equilibrio con estructuras del tipo  $\beta$ . Este péptido forma oligómeros estables en el pH, cuyos tamaños varían dependiendo de la concentración. Finalmente se mostró que las moléculas del inflammasoma, NLRP3 y caspasa-1, son claves en los mecanismos de daño en la mucosa intestinal inducido por p31-43.



## 5. *Discusión*

En este capítulo se utilizaron diferentes técnicas tanto biofísicoquímicas como de microscopía para caracterizar la estructura de p31-43, así como su comportamiento en soluciones acuosas, a diferentes pHs y concentraciones.

Utilizando dicroísmo circular se observó que p31-43 posee predominantemente un espectro característico de una estructura secundaria tipo poliprolina II. Además, en presencia de un agente caotrópico como Urea 8M, se obtuvieron espectros característicos de hélice tipo poliprolina II. En segundo lugar, utilizando TFE, un cosolvente que favorece las interacciones moleculares entre estructuras se observó que la estructura principal poliprolina II puede coexistir en equilibrio con estructuras secundarias tipo beta (Tamburro et al. 2005; Bochicchio y Tamburro 2002; Bochicchio, Pepe, y Tamburro 2001). Este comportamiento también fue observado en el 33-mer, otro péptido derivado de  $\alpha$ -gliadina (Darré et al. 2015; Herrera et al. 2015).

Por otro lado, se evaluó si p31-43 posee la capacidad de formar agregados en solución. Esto fue evaluado mediante espectroscopía de fluorescencia utilizando una sonda comercial llamada BODIPY que se une a agregados hidrofóbicos en solución (Smith et al. 2010). Aquí, se evidenció un incremento en intensidad de fluorescencia de la sonda, que correlaciona con la presencia de oligómeros en solución, cuya formación fue dependiente de la concentración de p31-43. Estos resultados se confirmaron mediante un ensayo de DLS, en el que se observó que dos poblaciones de oligómeros de p31-43 estaban presentes en solución y eran estables.

Para evaluar la presencia de oligómeros, se analizaron dos concentraciones de p31-43 (50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M) mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se observó que el péptido formaba espontáneamente oligómeros esféricos de  $13 \pm 3$  nm y

17 ± 7nm respectivamente, concluyendo que el tamaño de los agregados depende de la concentración del péptido. Además, se realizó un análisis por microscopía de fuerza atómica (AFM) para corroborar y complementar los resultados obtenidos por TEM, estudiando un rango más amplio de concentraciones y diferentes tiempos de incubación. Observamos que, a bajas concentraciones (5µM), se encontraba una sola población de oligómeros esféricos pequeños (2 ± 2 nm), a medida que aumentaba la concentración, (50µM), se observaron poblaciones heterogéneas con alturas desde 4 ± 1 nm hasta nanoestructuras de más de 50 nm. Esto concuerda con observaciones previas que muestran que p31-43 forma estructuras mayores de autoensamblado en forma dependiente de la concentración.

Por otro lado, realizamos un estudio de la formación de agregados en el tiempo mediante AFM. Se observó que los mecanismos de agregación difieren según la concentración evaluada. Muestras frescas de 10 µM de p31-43 presentaron oligómeros pequeños que, a medida que pasaba el tiempo, aumentaban su tamaño y se unían entre sí por coalescencia formando islas de mayor tamaño, los que luego de 14 días se encontraban en equilibrio con oligómeros pequeños. En el caso de muestras de 50 µM, se encontró un comportamiento llamativamente distinto, dado que inicialmente se observó una población heterogénea de oligómeros grandes y pequeños, que a medida que pasó el tiempo se transformaron en estructuras lineales y ramificadas, que se pudieron haber formado a partir de los oligómeros esféricos. Finalmente, a los 14 días las estructuras ramificadas se extendieron sobre toda la superficie, en equilibrio con oligómeros de menor tamaño.

El análisis *in silico* de p31-43 correlacionó con los datos estructurales obtenidos por métodos experimentales. En el modelado se observó que el péptido tiene capacidad de agregarse y que posee una estructura helicoidal tipo poliprolina II en su centro (P<sub>8</sub>, P<sub>9</sub>)



mientras que sus extremos tienen conformaciones extendidas tipo beta. Además, corroboró que agregados de p31-43 pueden mantenerse estables tanto en agua milliQ como en buffer fosfato, en un amplio rango de pHs desde 3 a 8. Esto último tiene una relación directa con la propiedad de este péptido en la inducción de daño en la mucosa intestinal. Si bien no podemos establecer la estructura que el péptido adquiere *in vivo*, estos resultados nos llevan a pensar que los agregados de p31-43 pueden formarse o permanecer estables en el lumen intestinal.

Recientemente, (Calvanese et al. 2019) se mostró un modelado de p31-43 que confirma la estructura que fue antes publicada en nuestro trabajo (Gómez Castro et al. 2019). Como hemos mencionado, no se ha encontrado el receptor de membrana celular de p31-43 (Paolella et al. 2018). Tampoco, han sido caracterizados los mecanismos de pasaje de p31-43 a través de la membrana celular. Sin embargo, como hemos mostrado en este trabajo, p31-43 es capaz de desencadenar efectos en tiempos muy cortos. Es por eso, que nos hemos preguntado cuáles podrían ser las vías de señalización involucradas. En este sentido, el inflammasoma NLRP3, ha sido considerado un sensor de nanoestructuras, sea en forma directa o bien como una señal derivadas del daño celular (Zmora et al. 2017).

Nuestros estudios realizados empleando ratones NLRP3<sup>-/-</sup> y Caspasa-1<sup>-/-</sup>, mostraron que la plataforma inflammasoma NLRP3 estaría involucrada en el mecanismo de daño en la mucosa intestinal inducido por administración intragástrica de p31-43.

La sobreactivación de este inflammasoma fue asociada a varias enfermedades (Song et al. 2017) como Alzheimer (Liu et al. 2017; Saresella et al. 2016), Parkinson (Cedillos 2013), enfermedades asociadas a estrés de retículo por proteínas mal plegadas (Shi, Kouadir, y Yang 2015), enfermedades cardíacas (Parry et al. 2015), o enfermedades respiratorias (Sayan y Mossman 2015).

Para la configuración activa del inflamasoma se requieren dos señales. En primer lugar, se necesita una activación de la vía  $\text{NF}\kappa\beta$  que permite la inducción de la expresión de NLRP3, caspasa -1 e IL-1 $\beta$ . Luego se requiere una segunda señal que promueva la formación por multimerización de la plataforma activa del inflamasoma (NLRP3, ASC, caspasa-1) (Zmora et al. 2017). Esta segunda señal, podría originarse por diversos ligandos que son detectados por el inflamasoma en forma directa (LPS, dipéptido de muramil, toxinas de hemolisinas formadores de poros, nigericina, ácidos nucleicos bacterianos y virales) o bien a partir de señales de daño o DAMPs: concentraciones altas de ATP, componentes derivados del daño mitocondrial, ROS, estrés de retículo endoplasmático (Mitoma et al. 2013; Murakami et al. 2012) o alteraciones del volumen celular (Compan et al. 2012), flujo intracelular de calcio y estímulos exógenos e irritantes ambientales, como cristales de ácido úrico, sílica, asbestos entre otros (Gómez, Urcuqui-Inchima, y Hernandez 2017; Zambetti et al. 2012; Re 2011; Hornung et al. 2008).

Se describe que debido a la heterogeneidad de componentes que pueden activar al inflamasoma debería existir un común denominador entre ellos en cuanto a la activación de NLRP3, un mecanismo posible postulado es la desestabilización lisosomal por el material fagocitado y la generación de ROS (Zmora et al. 2017).

En nuestro modelo murino de enteropatía, se mostró previamente que la vía de MyD88 es requerida para la inducción de daño *in vivo* por p31-43 (Araya et al. 2016). Esto podría constituir el paso inicial en la activación del inflamasoma NLRP3. En futuros estudios, nos proponemos identificar la segunda señal que conduce a la multimerización y activación de la plataforma. Esto es de relevancia no solo por la actividad proinflamatoria generada por la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18, sino además porque la activación de caspasa-1 genera muerte celular por piroptosis mediante poros en la membrana celular formados por Gasdermina D (Kayagaki et al. 2015). En nuestro modelo

de enteropatía, estos resultados permitirían explicar que la muerte celular podría ocurrir tanto por apoptosis como por piroptosis.

Apoyan esta conclusión, resultados de nuestro grupo (Gómez Castro, 2019) en los que se utilizó un inhibidor irreversible de Caspasa-1, denominado Ac-YVAD-cmk. El mismo fue administrado *in vivo* en animales C57BL/6, en los que se observó que los parámetros morfométricos característicos de la enteropatía no estaban presentes. De esta forma resulta claro el rol de caspasa- 1, en la inducción de enteropatía *in vivo* por p31-43.

En el momento de terminar la escritura de esta Tesis fue publicado un artículo (Maiuri et al. 2019) donde se mostró que p31-43 se une a una subunidad del canal de Cl<sup>-</sup> (CFTR) e inhibe su función, dado que promueve la conformación cerrada del canal. Esto tiene implicancias muy directas sobre la función de las células epiteliales, promoviendo una respuesta inflamatoria que involucra la activación de la vía NFκβ, TG2, producción de IL-15 y liberación de IL-1β. En conjunto, esto tiene enorme relevancia en los mecanismos de respuesta local y la enteropatía en EC. Estos nuevos hallazgos refuerzan la importancia de profundizar el conocimiento sobre la actividad biológica de p31-43 como péptido de gliadina modelo.



## 6. Conclusiones

- ❖ El péptido p31-43 posee una estructura secundaria tipo poliprolina II, en equilibrio con estructuras del tipo  $\beta$ .
- ❖ P31-43 puede agregarse y formar oligómeros en solución.
- ❖ Los oligómeros de p31-43 son estables a diferentes pHs y su tamaño depende de la concentración.
- ❖ La complejidad de los agregados de p31-43 varía con el tiempo.
- ❖ Las moléculas del inflamasoma NLRP3 y Caspasa-1 son necesarias para la inducción de daño en el modelo murino de enteropatía *in vivo*.



# DISCUSIÓN GENERAL





## Discusión general

En la presente tesis se desarrolló y caracterizó un modelo murino de enteropatía de intestino delgado proximal inducido por la administración intragástrica de p31-43, útil para estudiar etapas tempranas asociadas a la respuesta inmune innata en la patogenia de Enfermedad Celíaca.

Esta descripto que las proteínas derivadas de gluteninas y gliadinas, provenientes del gluten de trigo son parcialmente degradadas por enzimas digestivas y arriban al lumen intestinal (Figura 48 A). Entre las gliadinas resistentes se encuentran p57-68 y p31-43 capaces de inducir respuestas inmunes diferentes. Aquí describimos que p31-43 posee una estructura secundaria del tipo poliprolina II, y es capaz de formar agregados macromoleculares estables a pHs fisiológicos (pH:3.0-8.0), cuyo tamaño depende de la concentración. Por lo tanto, es posible que los oligómeros de p31-43 lleguen al lumen sin ser degradados o que se formen dentro de la célula. Consideramos que la secuencia de aminoácidos de p31-43, es crítica para la inducción de enteropatía *in vivo* y podría ser un factor determinante en su proceso de agregación.

Por otro lado, se ha descripto que p31-43 puede interaccionar con la membrana de células epiteliales intestinales (Zimmermann et al. 2014) y ser internalizado en vesículas demorando su maduración (Barone et al. 2010), esto produce la activación de la vía MyD88/NF $\kappa$ B (Nanayakkara et al. 2018). En este sentido, nuestros resultados confirman que tanto MyD88 como la vía de IFNs tipo I, están involucradas en el daño inducido por p31-43 en el modelo murino de enteropatía (Araya et al. 2016).

Los agregados de p31-43 que se arrestan en vesículas, impiden su maduración e interfieran con el correcto tráfico vesicular en la célula, lo que induce estrés celular (Luciani et al. 2010), estrés del retículo endoplasmático (evidenciado en nuestro modelo

murino mediante un aumento de BIP en la mucosa intestinal) y posiblemente estrés mitocondrial con producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (ROS<sub>m</sub>), (nuestros ensayos muestran despolarización del potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con p31-43, un fenómeno asociado a estrés mitocondrial).

Consideramos que la activación de la vía de MyD88/NFκβ podría constituir una primera señal de activación de la vía del inflamasoma NLRP3. El estrés celular mediante el ROS<sub>m</sub> y la pérdida del potencial mitocondrial podrían constituir DAMPs que proveerían una segunda señal de activación del inflamasoma NLRP3 (Zmora et al. 2017). Apoyan esta hipótesis, nuestros resultados *in vivo*, en los que observamos que las moléculas de NLRP3 y Caspasa-1, están implicada en la enteropatía inducida por p31-43. Si bien nuestros ensayos *in vivo* e *in vitro*, no presentaron variaciones en los niveles de ROS totales, consideramos que aún restan evaluar los niveles de ROS mitocondrial específicamente, esto resultaría de gran interés, para dilucidar los mecanismos de estrés inducidos por p31-43. En este sentido, en nuestro grupo se obtuvieron resultados recientes que muestran la activación del inflamasoma mediante la activación de ASC y la producción de IL-1β, que están implicados en el daño inducido por p31-43 (Gómez Castro et al. 2019).

En este trabajo de tesis demostramos que p31-43 induce apoptosis tanto en el modelo murino de enteropatía, como también *in vitro*. La activación del inflamasoma NLRP3 y la producción de citoquinas como IL-1β, contribuyen a la generación de un entorno proinflamatorio en el que los IELs podrían ser reclutados al epitelio intestinal, activarse y mediar la muerte de los enterocitos adyacentes. Sin embargo, aún resta dilucidar si otras vías de muerte celular están implicadas en el daño inducido por p31-43.

La Figura 48 resume aspectos destacados de este trabajo en relación al conocimiento actual sobre la patogenia de Enfermedad Celíaca.

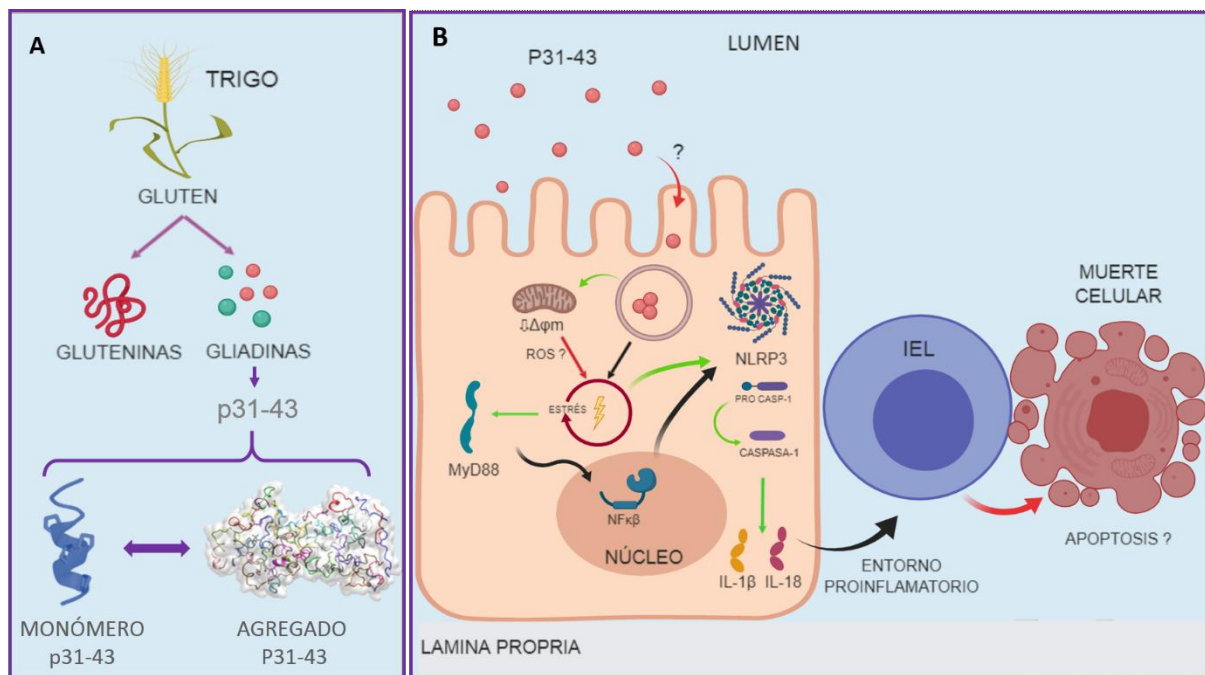


FIGURA 48. MECANISMOS DE DAÑO INDUCIDOS POR p31-43 EN EPITELIO INTESTINAL

En la imagen se presenta un modelo de las vías de señalización activadas por agregados de p31-43. **A.**-Se muestran proteínas de trigo, subdivididas en gluteninas y gliadinas resistentes a la degradación enzimática, que llegan al lumen intestinal. El péptido p31-43 posee la conformación de monómero poliprolina II o puede formar agregados. **B.**-Se presenta un modelo de las vías que podrían estar involucradas en los efectos de p31-43. Esta propuesta de mecanismos se basa tanto en resultados propios presentados en este trabajo de tesis (flechas verdes), como en bibliografía actualizada acerca del péptido p31-43 (flechas negras), además se muestran vías sobre las que aún se desconoce el mecanismo exacto (flechas rojas).



# CONCLUSIONES GENERALES



## Conclusiones generales

- ❖ P31-43 administrado por vía oral o intraluminal induce enteropatía en ratones C57BL/6 y BALB/c.
- ❖ La enteropatía inducida es específica de la secuencia de aminoácidos de p31-43.
- ❖ La enteropatía inducida por p31-43 es dependiente de la vía de IFNs tipo I.
- ❖ P31-43 induce apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo*.
- ❖ P31-43, administrado por vía oral a ratones NOD-DQ8 desafiados con gluten durante 4 semanas, induce aumento de proliferación no específica de células de bazo.
- ❖ P31-43 posee una estructura secundaria del tipo poliprolina II, y forma agregados proteicos en solución de diferentes tamaños que evolucionan en el tiempo a estructuras más complejas. Estos agregados son estables a pHs del tracto digestivo.
- ❖ Las moléculas del inflamasoma NLRP3 y Caspasa-1 están implicadas en el daño inducido por p31-43.





# MATERIALES Y MÉTODOS



# Materiales y métodos

## 1. Animales utilizados

Los ensayos descritos en este trabajo de tesis se realizaron utilizando cepas de ratones provenientes de diferentes instalaciones. Las mismas se detallan a continuación en la tabla 2, así como también la nomenclatura que se utilizó durante todo el trabajo de tesis.

TABLA 2. RATONES UTILIZADOS

Cepa	Nomenclatura en este trabajo	Origen	Alojamiento
<b>C57BL/6</b>	C57BL/6	Bioterio de la facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP), Buenos Aires, Argentina.	Bioterio IIFP
<b>B6(Cg)-Ifnar1<sup>tm1.1Ees</sup>/J</b>	IFN $\alpha$ R <sup>-/-</sup>	Bioterio de CIBICI (CONICET) Córdoba, Argentina	Bioterio IIFP
<b>BALB/c</b>	BALB/c	Bioterio Central de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil	Bioterio del Laboratorio de Inmunobiología (LIB)
<b>B6N.12952-Casp1<sup>tmflv</sup>/J</b>	Caspasa 1/11 <sup>-/-</sup>	Bioterio del Instituto Pasteur de Uruguay	Instituto Pasteur de Uruguay
<b>B6.12956-Nlrp3<sup>tm1Bhk</sup>/J</b>	NLRP3 <sup>-/-</sup>	Bioterio del Instituto Pasteur de Uruguay	Instituto Pasteur de Uruguay
<b>NOD AB<sup>o</sup> DQ8</b>	NOD-DQ8	Animal facility center CAF-McMaster University	Sala SPF en CAF-McMaster University-Canadá

En todos los casos los animales se mantuvieron en ambientes con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y recambio periódico de aire. La temperatura fue controlada en todos los casos y se mantuvo a alrededor de 22 °C, además poseían alimento balanceado y agua *ad libitum*.

C57BL/6: Se utilizaron ratones libres de patógenos (SPF) machos de 7 a 8 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP). Estos ratones se alojaron en cajas plásticas en

el bioterio del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP-CONICET) de La Plata.

BALB/c: Se utilizaron ratones hembra de 7 semanas de edad, los mismos se alojaron en racks ventilados hasta su utilización en el Bioterio Central de la Universidad Federal de Mina Gerais (UFMG), dependiente del Laboratorio de Inmunobiología a cargo de la Dra. Caetano Farias en el Instituto de Ciencias Biológicas (ICB) de la Universidad Federal de Mina Gerais (UFMG) en Belo Horizonte, Brasil.

IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup> (IFN  $\alpha\beta$  R<sup>-/-</sup>, IFN  $\alpha$  R<sup>-/-</sup>): Se utilizaron ratones macho de 7-8 semanas de edad, cuya colonia inicial provino del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET, Córdoba, Argentina). Posteriormente, la reproducción y mantención de estos animales se realizó en el Bioterio central de la Facultad de Ciencias Exactas de la Plata, en racks ventilados hasta su utilización.

NOD-DQ8: Estos animales poseen moléculas de HLA-DQ8, asociadas a la susceptibilidad genética de EC, en un contexto de deficiencia de MHC Clase II endógeno. Los mismos se cruzaron por 10 generaciones con ratones NOD (non obese diabetes), que poseen susceptibilidad a desarrollar diabetes y aportan un componente de autoinmunidad al modelo, hasta que finalmente se obtuvieron ratones congénicos. En los ensayos descritos en esta tesis se utilizaron ratones hembra de 8 semanas de edad para los experimentos. Estos ratones fueron mantenidos en una dieta baja en grasas (4%P/P) y libre de Gluten, en una sala SPF que poseía filtros HEPA para el aire que ingresaba a la habitación, perteneciente al Bioterio Central de la Universidad McMaster en Canadá (CAF) bajo la supervisión de la Dra. Elena Verdú.

Caspasa 1/11<sup>-/-</sup> y NLRP3<sup>-/-</sup>: Se utilizaron ratones NLRP3<sup>-/-</sup> y CASPASA 1/11<sup>-/-</sup> machos de 7 semanas de edad provenientes del Bioterio del Instituto Pasteur de Uruguay.

## **2. Análisis histológico**

El análisis morfométrico de la atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas en porciones de duodeno es una herramienta ampliamente utilizada en el diagnóstico de EC a partir de secciones de biopsias intestinales. En nuestro modelo animal utilizamos este parámetro para caracterizar los efectos del péptido p31-43 en intestino delgado. Se midió la altura de las vellosidades (V) y la profundidad de las criptas (C), para determinar la relación V/C (Figura 48 A). Se realizan como mínimo 20 medidas por ratón. En el caso de observar un descenso en este parámetro, se correlaciona con la presencia de daño en la mucosa intestinal.

Otro parámetro relevante en la enteropatía de EC es la presencia de infiltrado linfocitario en la mucosa duodenal. En nuestro modelo murino se realizó el recuento de linfocitos intraepiteliales (IELs) que fue evaluado como el número de IELs cada 100 enterocitos en 10 puntas de vellosidades elegidas al azar (Figura 48 B). En este trabajo de tesis consideramos que se desarrolló enteropatía en el modelo murino si se observa una disminución en la relación V/C y un aumento en el número de IELs/100 enterocitos.

Se utilizaron piezas de intestino delgado proximal de 1cm, que se colocaron en formol 4 %v/v por 24 horas. Posteriormente se retiró el tejido y se colocó en canastillas plásticas, se hizo un pasaje de 1 minuto por diferentes concentraciones de alcoholes, (50 %, 70 %, 95 %v/v , Etanol absoluto I, Etanol absoluto II) para deshidratarlas, luego se hicieron 3 pasajes por Xilol de 5 minutos (Xilol I, Xilol II, Xilol III) y finalmente se colocaron en un recipiente con parafina (Biopack) durante 1 hora, finalmente se colocaron los tejidos en moldes plásticos donde se los orientó y se colocó la tapa de la canastilla plástica, para conformar los tacos de parafina.

Luego de 24 horas, se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un micrótomo (Leica SM 2000R), se depositaron en un portaobjetos de vidrio y fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (Biopack). Se tomaron imágenes con el microscopio óptico Nikon Digital Sight DS Ri1, usando el software "Nis-Elements", con un aumento de 20 X y 40 X. El análisis de las imágenes se realizó con el programa "Image J" utilizando imágenes adecuadamente calibradas para cada aumento.

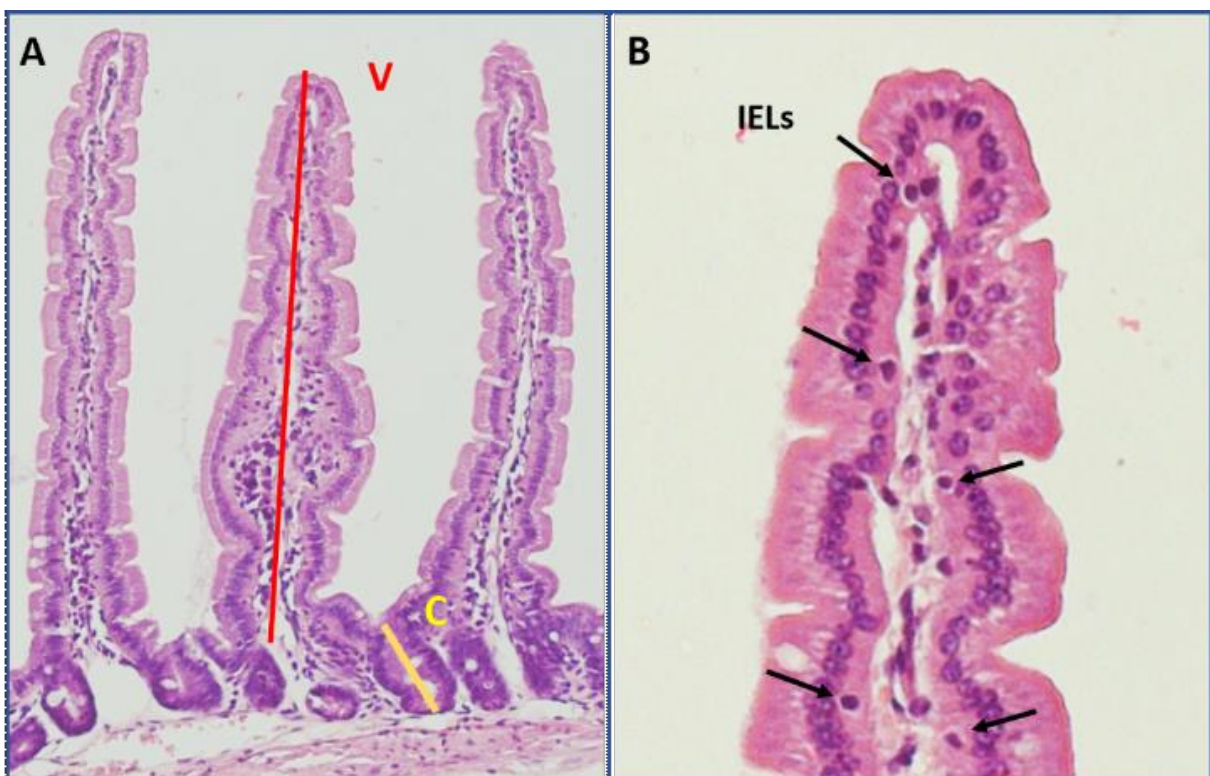


FIGURA 49. IMÁGENES REPRESENTATIVAS PARA ESQUEMATIZAR EL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Se presentan imágenes representativas de cortes histológicos de intestino delgado teñidos con H&E. **A.**-Imagen a 20X, en la que se pueden observar los parámetros medidos en la relación V/C, en rojo la altura de una vellosidad y en amarillo la profundidad de una cripta. **B.**-Imagen a 40X, en la que se observa la punta de una vellosidad y con flechas negras se indican los IELs.

### 3. Intervenciones y manipulaciones con animales

#### 3.1. Inoculación intraluminal

Se utilizó anestesia inhalatoria con isoflurano (0,5 – 1 %v/v) utilizando oxígeno como vehículo para realizar microcirugías en ratones de diferentes cepas ( C57BL/6, BALB/C e IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup>) de 7 a 8 semanas de edad a los que se les inyectó intraluminalmente diferentes estímulos (ver tabla 3) entre ellos, péptido p31-43; péptidos sintéticos con la misma composición de aminoácidos que p31-43 pero con secuencia invertida o secuencia al azar; péptido no relacionado o PBS dependiendo del ensayo. Se evaluaron diferentes dosis de estímulos (1  $\mu$ g/mL y 10  $\mu$ g/ratón) y luego de 16 horas post estimulación se sacrificaron los animales y se colectó el intestino delgado para la realización de los análisis morfométricos.

TABLA 3.SECUENCIAS DE PÉPTIDOS UTILIZADOS

Nombre del péptido	Secuencia aminoacídica	Peso molecular(g/mol)	proveedor
<b>P31-43</b>	LGQQQPFPPQQPY	1526,71	Biomedal
<b>Péptido invertido (Pinv)</b>	YPQQPPFPQQGL	1526,71	Biomedal
<b>Péptido al azar (Pazar)</b>	YQPLFQPQGPQPQ	1526,71	Biomedal
<b>Péptido no relacionado (PNR)</b>	LDPLIRGLLARPACALQV	1918,37	Biomedal

#### 3.1.1. Inoculación con colorante azul de Evans

Se utilizó un colorante no permeable denominado azul e Evans (EB, T-1824) con alta afinidad por seroalbúmina, en presencia de daño en la membrana plasmática EB ingresa en el citoplasma y en el núcleo de las células tiñéndolas de Azul. Este colorante se

administró mediante una microcirugía a ratones C57BL/6 y se inyectó una solución de 200 o 100  $\mu\text{L}$  de EB (1 %P/V), luego de 16 hs se sacrificaron los animales y se midió la distancia recorrida por el colorante.

### 3.2. Inoculación intragástrica

Planteamos mejorar el modelo murino previamente desarrollado. Debido a que consistía en un proceso quirúrgico para la administración de los estímulos, que por sí tiene una complejidad asociada mucho mayor, porque se precisa de dos personas entrenadas en el quirófano, de material de cirugía, equipo anestésico y cabina de seguridad biológica adecuados. Por lo que, enfocándonos primordialmente en el bienestar animal, así como en la bioseguridad del operador y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Se modificó la vía de Inoculación de los estímulos y se realizó una administración intragástrica. En el trabajo de tesis se realizó inoculación intragástrica en ratones de 7 a 8 semanas de edad. A estos animales se les administró 200  $\mu\text{L}$  de p31-43 utilizando una sonda curva con bolilla en la punta de calibre 22 G y longitud 3,8 cm, evaluación de la enteropatía se realizó mediante un análisis morfométrico.

A los animales de la cepa C57BL/6 se les administró p31-43 a diferentes dosis dependiendo del ensayo 5, 10 o 20  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  de péptido p31-43 o PBS como control de vehículo. Los animales se sacrificaron luego de 4h, 16h, 48h, 72h o 1 semana post estimulación. Por otro lado, a los animales de la cepa NLRP3<sup>-/-</sup> y Caspasa1/11<sup>-/-</sup>, se les administró 20  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  de péptido p31-43 o PBS como control de vehículo y los animales se sacrificaron luego de 16 h post estimulación. Finalmente, en el caso de animales de la cepa NOD-DQ8 se utilizaron hembras de 8 semanas de edad a las que se les administró 20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$  de péptido p31-43 o PBS y se sacrificaron los animales luego de 16h. Sin embargo, en el ensayo de la evaluación a largo plazo de la administración de p31-43,



luego de las 16h post administración de p31-43, se comenzó con los desafíos con gluten (Sigma). Los mismos consistieron en una administración 3 veces por semana, por un periodo total de 4 semanas, de 200  $\mu$ L de solución conteniendo 2 mg de gluten/ratón diluido en ácido Acético (0,02 M). Luego de finalizar las 4 semanas se realizó el sacrificio de los animales, todos el mismo día. Finalmente se tomaron muestras de bazo (en esterilidad) para el ensayo de proliferación de duodeno proximal, para análisis morfométrico y el de permeabilidad tisular utilizando las cámaras “ussing chambers”.

#### ***4. Medidas de expresión utilizando PCR cuantitativa***

Para estos estudios se utilizaron muestras de intestino delgado de ratón que se preservaron en RNA later (Ambion) por una noche a 4 °C y luego se colocaron en un freezer a -20 °C hasta el momento de la extracción de RNA. En los casos en que se decidió conservarlas a largo plazo se retiró el excedente de RNA later de los tubos y se colocaron en un freezer a -80 °C hasta su utilización.

La extracción de RNA se realizó usando el kit de aislamiento “*Illustra RNA spin mini RNA isolation Kit*” (GE Healthcare). El RNA extraído se cuantificó usando un Nanodrop (Termofisher). Se realizaron diluciones del RNA, para tener la misma cantidad de molde. La síntesis de cDNA en todas las muestras se realizó a partir de muestras de RNA aisladas (2-5  $\mu$ g), usando iScript Reverse Transcription. Se incubó en el termociclador con el siguiente programa para realizar la transcripción reversa:

- 5 minutos a 25 °C
- 50 minutos a 37 °C
- 15 minutos a 70 °C
- Mantener temperatura a 4 °C

La reacción de PCR en tiempo real utilizó una mezcla denominada “SYBR green PCR Master mix” (BioRad), y un termociclador con detección de fluorescencia “iCycler” (Bio-Rad). En la tabla 4 se presentan las secuencias de los primers directos y reversos utilizados, a una concentración final de 10mM. Las reacciones se hicieron por triplicado para cada muestra. El protocolo de PCR en tiempo real (qPCR) utilizado en el equipo fue el siguiente:

- Ciclo 1 (1 X) 95 °C por 10 minutos.
- Ciclo 2 (40 X) 60 °C por 1 minuto.
- Mantener a 95°C por 15 segundos

En todos los casos se utilizó el gen *hprt* como control interno para normalizar los niveles de expresión. Todos los resultados se expresan como incremento de cada tratamiento, referidos a la media del tratamiento control con PBS. El método de análisis utilizado fue el de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

TABLA 4. SECUENCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS

Gen	Directo	Reverso
<i>hprt</i>	CAATGCAAACCTTTGCTTTCC	CAAATCCAACAAAGTCTGGC
<i>ifn β</i>	AATGGAAAGATCAACCTCAC	AAGGCAGTGTAACCTTTCTG
<i>ifn γ</i>	CTGAGACAATGAACGCTACAC	TTTCTTCCACATCTATGCCAC
<i>cxcl10</i>	ATAGGGAAGCTTGAAATCATCC	TTCATCGTGGCAATGATCTC
<i>il1-α</i>	TTTCTGGCAACTCCTTCAGC	ATCTCAGATTCACAACCTGTTTCG
<i>bax</i>	TGCTACAGGGTTTCATCCAG	ATTGCTGTCCAGTTCATCTC
<i>bcl-2</i>	GATCTCTGGTTGGGATTCCT	ACAACCTGCAATGAATCGGG

## **5. Análisis de permeabilidad de tejido de intestino delgado**

Se decidieron analizar variaciones en la permeabilidad y funcionalidad del epitelio intestinal. Para esto se utilizó un equipo denominado “Ussing Chamber” perteneciente en el laboratorio de la Dra. Verdú, caracterizado previamente (Galipeau et al. 2011; Verdu, Armstrong, y Murray 2009; de Kauwe et al. 2009).

Para realizar estas determinaciones se utilizó una sección de intestino delgado de aproximadamente 1,5 cm de largo de la región del duodeno. La misma se cortó longitudinalmente y se obtuvo una lámina plana que se colocó en un soporte acrílico que expuso un área de 0,7 cm<sup>2</sup> a 8 mL de buffer Krebs (ver composición en Anexo) aireado con 95 %v/v de O<sub>2</sub> y 5 %v/v de CO<sub>2</sub> (pH= 7,3- 7,4). El lado basal del tejido se puso en contacto con buffer Krebs+ 10 mM de glucosa, mientras que el lado luminal estaba en contacto con buffer Krebs + 10 nM de Manitol. El sistema se mantuvo a una temperatura constante de 37 °C. Se utilizaron electrodos para medir la diferencia de potencial de la membrana ( $v_{te}$ ) y para determinar la corriente transepitelial o corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ ), la misma refleja el transporte activo de iones que ocurre en la membrana. A partir de este valor se puede calcular la Resistencia eléctrica transepitelial ( $R_{Te}$ ), la misma refleja la integridad del tejido en relación con la permeabilidad paracelular. Se puede obtener su valor utilizando la ley de Ohm  $R_{Te} = \frac{\Delta v_{Te}}{\Delta I_{sc}}$ . Siendo  $\Delta v_{te}$  la diferencia de potencial de membrana y  $\Delta I_{sc}$  la diferencia de corriente transepitelial.

Por otro lado, la Conductancia transepitelial ( $G_{Te}$ ), que nos permite obtener información acerca del transporte pasivo de iones, se calculará como  $G_{Te} = \frac{1}{R_{Te}}$ .

Finalmente, para el estudio del flujo de solutos o flujo isotópico a través del tejido, se utilizó un radioisótopo denominado <sup>51</sup>Cr-EDTA (1 μCi), ampliamente utilizado tanto en

animales como humanos para el estudio cuantitativo del transporte paracelular a través del epitelio intestinal. Esta sonda se ha demostrado que no es metabolizada in vivo, sino que es rápidamente excretada por los riñones y desechada en la orina. En nuestro sistema, la sonda se agregó al compartimiento del lado basolateral de la mucosa y se tomaron muestras del lado luminal, cada 30 minutos, durante 4 horas. Posteriormente se midió la radioactividad en un contador de centelleo y se expresó como el porcentaje recuperado, sobre el total administrado.

## ***6. Cultivo celular de líneas THP-1 y HT29***

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo de tesis se mantuvieron en todos los casos, a 37 °C en una estufa con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células THP-1 son monocitos humanos derivados de un paciente de 1 año con leucemia monocítica aguda, estas células producen lisozimas y son fagocíticas, además de pueden diferenciar a macrófagos. Estas células crecen en suspensión y se mantuvieron en botellas plásticas de 5 ml con buffer RPMI completo (Ver composición en Anexo),

La línea celular HT29 es un adenocarcinoma de colon humano y posee una morfología epitelial con ultraestructuras como microvellosidades y microfilamentos; mitocondrias vacuoladas largas; tiene lisosomas primarios y secundarios. Las células se mantuvieron en botellas plásticas de 5ml con medio DMEM completo (Ver composición en Anexo).

Todos los medios de cultivo utilizados fueron esterilizados por filtración (Filtro 0,22µm).

Previo a la realización de los ensayos ambas líneas celulares se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 300.000 células /mL, Solo en el caso de las células HT29 luego de 2-3 días se observó confluencia de las células. Los ensayos de estimulación

consistieron en administrar en cada pocillo p31-43 a una concentración de 100µg/mL o medio de cultivo como control sin estimular.

## ***7. Obtención de suspensiones celulares***

### **7.1. Aislamiento de células de bazo de ratón**

Se utilizaron ratones NOD-DQ8. El día del experimento se sacrificaron los animales y se extrajeron los bazos en condiciones de esterilidad, se colocaron en buffer Hanks (HBSS, GIBCO, ver composición en Anexo) frío hasta el final del sacrificio para que todas las muestras pudieran ser procesadas en simultáneo. Se colocaron los bazos en tapas de placas de Petri y se retiró todo el exceso de grasa. Luego se procedió a colocar cada bazo en la base de una placa de Petri con HBSS fresco y un filtro de células (40µm), se disgregó el tejido con un embolo de una jeringa de 3mL. Posteriormente se colocó el mismo filtro de células de 40 µm en un tubo de falcón (50ml) y se filtró la suspensión celular. Se centrifugó (1240 rpm 10 minutos a 4°C) y se descartó el sobrenadante.

Luego se agregaron 5mL de Buffer ACK de lisis de glóbulos rojos (GIBCO), se incubó en agitación leve durante 5 minutos, se agregaron 10 mL de HBSS a todas las muestras rápidamente, se centrifugó (1240rpm, 10 minutos a 4°C), se descartó el sobrenadante, y se resuspendió en 3 mL de medio RPMI completo enriquecido (Ver composición en Anexo).

Finalmente se filtraron las células pasándolas por un nuevo filtro celular de 40 µm. Se contaron las células utilizando azul Tripán (dilución 1:40), se diluyeron en medio completo enriquecido hasta obtener una concentración de  $8 \times 10^6$  células/mL, y se mantuvieron en hielo.

## **7.2. Aislamiento de fracción de células epiteliales de ratón**

Se utilizó una sección de 10 cm de intestino delgado proximal para y se colocaron en una solución fría de HBSS (GIBCO), libre de calcio y magnesio, para su conservación y lavado. Posteriormente se incubaron en una solución de HBSS con 2%v/v de Suero fetal bovino (SFB) y 0,1 mM DTT (Sigma) a 4 °C por 10 minutos. Seguida de una incubación con HBSS y 0,5 mM EDTA (Sigma), a 37 °C por 20 minutos, con agitación vigorosa. Finalmente, la suspensión celular fue filtrada utilizando filtros de red plásticos de 80 µm (BD, Bioscience) y se procedió a contar las células obtenidas. Para los análisis por citometría de flujo, que se describirán a continuación, se utilizaron aproximadamente 1 millón de células y el resto se conservó en RNA later (Ambion) para posteriores análisis de PCR cuantitativa en tiempo real.

## ***8. Citometría de flujo***

### **8.1. Análisis de proliferación de células de bazo específicas de gliadina**

Para realizar la medida de la proliferación de células T específicas a gliadina se realizó la determinación de la intensidad de fluorescencia de células marcadas con un fluorocromo denominado CFSE (Carboxifluoresceína *N*-succinimidil ester), por citometría de flujo. Un día antes del sacrificio de los animales se prepararon las placas que servirán como controles positivos de proliferación del ensayo (observar inciso “e” a continuación). Para realizar el estudio se utilizaron células de bazo de ratón aisladas (descrito en el inciso 8.7.1) que se encontraban en medio RPMI enriquecido, a una concentración final de  $8 \times 10^6$  células /mL y se mantuvieron en hielo hasta la marcación con CFSE.

## *Materiales y métodos*

Para la marcación con CFSE se utilizó PBS a temperatura ambiente y se realizaron 6 replicados por cada condición (PT-Gliadina, medio, controles positivos), además se reservaron células para los controles positivos de CFSE y para los controles de fluorescencia menos uno (FMO). Luego de tomar el volumen necesario de células por cada condición, se colocaron en un tubo falcón nuevo se centrifugaron y resuspendieron en PBS a temperatura ambiente para realizar la marcación con CFSE se colocan 3ul de solución de trabajo (18 µL de DMSO por cada 1 vial de CFSE), en oscuridad y se mezcla suavemente el tubo luego de agregar el CFSE. Se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se agregan 15mL de RPMI completo frio, se incubó en oscuridad 5 minutos en hielo, y se realizaron 3 lavados con RPMI completo (10mL). Finalmente, se resuspendieron las células en medio RPMI enriquecido para obtener una concentración final de  $8 \times 10^6$  células /mL.

Para evaluar la proliferación específica con gliadinas se utilizaron placas de 96 pocillos (VWR, Norte América), una placa para cada tratamiento (PBS, p31-43) y condición como se detalla a continuación:

- a) PT-gliadina (0,5mg/mL) +células de bazo de animales tratados con PBS
- b) PT-gliadina (0,5mg/mL) + células de bazo de animales tratados p31-43
- c) Medio (RMPI) + células de bazo de animales tratados con PBS
- d) Medio (RPMI) + células de bazo de animales tratados con p31-43
- e) Controles positivos de proliferación:
  - i) Placa con anti-CD3 unido(5µg/ml) y anti-CD28 soluble (2 µg/ml)
  - ii) Mitad de placa con anti-CD3 unido(5µg/ml) y anti-CD28 unido (2 µg/ml) y la otra mitad solo con anti-CD3 unido(5µg/ml).
- f) Células sin marcar: mitad de placa con una mezcla de todas las células, del grupo de PBS y mitad de placa con las del grupo de p31-43.

- g) Controles marcados con CFSE: mitad de placa con mezcla de todas las células, del grupo de PBS y mitad de placa con p31-43.

Luego de sembrar las células en todas las placas y de estimular los pocillos correspondientes con PT-gliadina, las placas se mantuvieron en estufa por 4 días a 37°C y 5%v/v CO<sub>2</sub>.

Para la marcación de las células para su adquisición por citometría de flujo, se debieron realizar todos los procedimientos en oscuridad y en hielo. Luego de los 4 días de incubación se retiraron las placas y se centrifugaron (200 rpm 5 minutos con freno bajo a 4°C. Finalmente se resuspendieron las células en 200µL de buffer FACS y se mantuvieron en hielo. Se colocaron las células en una placa con fondo cónico.

El panel de anticuerpos utilizados se puede observar en la tabla 5. En primer lugar, se realizó la marcación para evidenciar viabilidad de las células. Se colocaron 100µL de una dilución 1/2000 de la sonda de viabilidad en los pocillos correspondientes (incluyendo los controles FMOs, la simple marca y los controles positivos). Se agregó PBS en el resto de los pocillos sin marca. Se incubó en hielo durante 30 minutos, en oscuridad. Luego de la incubación se lavó la placa y se agregaron 25 µL del anticuerpo de bloqueo (Anti-CD16/32; 0,5 µL por pocillo). Se incubó durante 15 minutos en hielo y oscuridad. Posteriormente se agregó la mezcla de anticuerpos, y los controles de FMO en los pocillos correspondientes y buffer FACS a las células sin marcar, a los controles positivos con CFSE y al control positivo de viabilidad. Se incubaron los anticuerpos por 30 minutos en hielo y oscuridad. Se realizaron dos lavados con buffer FACS y se adquirieron en el citómetro de flujo (LSR II BD Cytometer), utilizando el software BD FACS DIVA.



TABLA 5. PANEL DE ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO ESPECIFICO DE GLIADINAS

Antígeno	Fluorocromo conjugado	Dilución utilizada	Marca comercial	N° de catálogo
CD38	PE	1/100	Biologend	102708
CD4	BV421	1/200	Biologend	100563
CD3e	BV785	1/200	Biologend	100232
CD44	APC	1/200	Biologend	103012
Viabilidad efluor780	APC-cy7	1/2000	Ebiosience, thermofisher	65-0865-14
CD16/32	Anticuerpo de bloqueo	(0,5µl/muestra)	Biologend	101302

## 8.2. Análisis de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se utilizó el colorante 2',7' -diclorofluorescin diacetato (DCFDA, también conocido como H2DCFDA) (Abcam). Se colocaron 100 µl de una suspensión celular  $5 \times 10^5$  células/ml de células, THP-1 o de la fracción epitelial extraída y se agregó 100 µl de la sonda ROS (1/1000). Luego se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en PBS para pasarlas por el citómetro. Es importante remarcar que ninguna de las soluciones utilizadas para esta marcación debe tener suero ya que interfiere con la sonda. En los casos que fuera relevante se agregó ioduro de propidio (1 µg/mL), inmediatamente antes de pasarlas por el equipo.

## 8.3. Medida de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial

Para analizar los efectos del péptido p31-43 en células THP-1 se utilizó la sonda JC-1 (Ioduro de 5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina, MitoProbe™, Termofisher). El mismo es un colorante catiónico que se acumula en las

mitocondrias. A bajas concentraciones (debidas a bajos potenciales de membrana mitocondrial), JC-1 es predominantemente un monómero que produce fluorescencia verde, con emisión de 530 nm. Mientras que a altas concentraciones (debidas a un alto potencial de membrana mitocondrial) el colorante se agrega produciendo emisión roja anaranjada de 590 nm. Por lo tanto, un descenso en el agregado fluorescente puede ser indicativo de despolarización de la membrana mitocondrial. El índice de despolarización mitocondrial se expresa como la relación entre intensidad de fluorescencia Roja/Verde.

Para realizar los ensayos se utilizó una suspensión  $5 \times 10^5$  células/mL que se colocó en eppendorfs, a los que se les agregó 1  $\mu$ L de la sonda JC-1 (200  $\mu$ M) mientras se agitaban vigorosamente con un vortex. Este paso es extremadamente importante para lograr que la sonda marque uniformemente. Posteriormente, se colocaron los tubos a 37°C en oscuridad durante 20 minutos, se realizó un lavado con PBS y se adquirieron con el citómetro.

Como control de despolarización se utilizó 1  $\mu$ L de FCCP (25  $\mu$ M, Abcam) por cada 200  $\mu$ L de suspensión celular, previo a la marcación con JC-1. El FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, Abcam) es un desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Es importante dejar que el vial con FCCP se estabilice a temperatura ambiente previo a la realización del ensayo.

#### 8.4. Análisis de apoptosis mediante Anexina V/Ioduro de propidio

Para el análisis por citometría de flujo de células apoptóticas tempranas y tardías, se utilizó una suspensión celular conteniendo  $5 \times 10^5$  células/mL provenientes de la fracción celular epitelial extraída de intestino delgado o de líneas celulares (THP-1 o HT29). Para obtener la suspensión de células THP-1 se procedió a levantarlas de la placa, lavarlas y resuspenderlas en PBS. Mientras que en el caso de células adherentes HT29 se

## *Materiales y métodos*

centrifugó la placa completa, se retiró el medio de cultivo y se agregó 150µl de solución TrypLE™ Express (Gibco) por pocillo, se incubó durante 10 minutos a 37 °C en agitación. Pasado este tiempo, se agregó el doble de volumen de PBS con 2% de suero para lavarlas.

Para realizar la marcación, se resuspendieron en 100µL de un buffer de unión adecuado para Anexina denominado “Buffer Binding” (BD Biosciences, ver composición en Anexo). Posteriormente se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4 °C utilizando un anticuerpo específico para Anexina V (BD, Dilución 1/300) conjugado a FITC. Finalmente se agregó Ioduro de propidio (BD) a una dosis de 1 µg/mL inmediatamente antes de adquirir las células en el citómetro. Se utilizó un citómetro FACSCalibur (BD Bioscience) y los datos se procesaron con el software “CELLQest” (BD Bioscience). Los análisis posteriores se realizaron con el programa “FlowJo.10”.

## ***9. Análisis de apoptosis en tejido intestinal mediante TUNEL***

Se utilizaron ratones C57BL/6, a los que se les inoculó por vía oral p31-43 (20 µg/ratón) o PBS. Luego de 4 o 16 horas de la administración, las muestras de intestino fueron incluidas en parafina, se realizaron secciones de 5µm y se procedió a realizar el protocolo de TUNEL (DeadEnd™ fluorometric TUNEL System, Promega). Las secciones se desparafinaron y rehidrataron siguiendo el tren descrito en el inciso 3.1.2. Los cortes se trataron con PFA (Formaldehído libre de metanol) 4%P/V, pH=7,4, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con PBS y se incubó en gota hidrofóbica con Proteínasa K (dilución 1/500, contenida en el kit Promega) por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado con PBS y se volvió a incubar con PFA 4%P/V por 5 minutos. Luego de esto se realiza un lavado con PBS y se incuba con un buffer de equilibrio (EB) contenido en el kit, por 10 minutos. La solución enzimática de

marcación para este kit posee las siguientes proporciones: 8,8  $\mu\text{L}$  de EB+ 1  $\mu\text{L}$  de nucleótidos dUTP marcados con fluoresceína + 0,2  $\mu\text{L}$  de Enzima recombinante rTdT (desoxinucleotidil transferasa terminal). Se debe recordar utilizar un control negativo, con todos los componentes anteriores excepto la enzima rTdT, para poder descartar pegado inespecífico de nucleótidos. Se colocó una gota de esta mezcla enzimática por muestra y se incubó en gota hidrofóbica cubriendo todo el vidrio con un film plástico durante 1 hora en cámara húmeda, estufa a 37°C en oscuridad. Luego de este tiempo se incubó en solución SSC 2x (contenida en el kit, Promega), por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con PBS y se marcaron los núcleos con DAPI (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las muestras se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Ti Eclipse) y OLYMPUS FV.1000, con el que se tomaron imágenes para realizar el recuento de células positivas. El análisis de imágenes se realizó con el software Image J y se superpusieron los canales verde y azul. Aquellas células que presentaron co-localización entre verde y azul, aparecen de color cian en las imágenes, se consideraron TUNEL positivas.

## ***10. Inmunofluorescencia en tejido intestinal murino***

Para realizar el protocolo de inmunofluorescencia se utilizaron secciones de intestino delgado de 5  $\mu\text{m}$  de espesor provenientes de ratones tratados con p31-43 (10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) o PBS, las mismas fueron desparafinadas siguiendo el siguiente tren de soluciones:

- Xilol 3 x 5 min c/u
- Alcohol 100% 2 x 2 min c/u
- Alcohol 96% 2 min
- Alcohol 70% 2 min
- Alcohol 50% 2 min
- Agua Destilada 5min

Posteriormente se realizó la recuperación Antigénica, utilizando “*Antigen Retrieval CITRA PLUS Solution*” (Biogenex). Se utilizó un coplin plástico y potencial máxima de un microondas durante 15 minutos y se dejó enfriar por 30 minutos. Se permeabilizó con una solución de PBS-Tween 20 al 0,01%v/v y se bloqueó con suero de cabra al 2%v/v durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Para la marcación con BIP se realizó la incubación con un anticuerpo monoclonal en conejo anti-BIP (Cell signalling, C50B12, #3177) a una dilución 1/50 en PBS-suero de equino 2% por 1 hora temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de este tiempo los vidrios se lavaron con PBS-Tween 0,1% y se incubó con el anticuerpo secundario obtenido en cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488 a una dilución 1/200, en suero equino al 2%v/v por 1 hora a temperatura ambiente en cámara humera y oscuridad. Finalmente, para observar los cortes en el microscopio confocal se marcaron los núcleos con Ioduro de Propidio (*Sigma*) 1ug/ml en PBS, por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se realizaron 3 lavados con agua destilada y se montaron los vidrios para su observación. Las imágenes se analizaron utilizando el microscopio confocal TCS SP5 combinado al programa Leica LAS-AF utilizando un láser a 488nm.

## ***11. Dicroísmo circular***

Para determinar la estructura secundaria de p31-43 se realizó dicroísmo circular (CD) de soluciones de diferentes concentraciones de péptido (10, 50, 100, 200, y 500  $\mu\text{M}$ ). Las medidas se adquirieron utilizando un polarímetro espectrómetro Jasco J-810 CD, usando un sistema peltier para el control de la temperatura. Para los ensayos se realizaron 5 determinaciones por muestra en el rango de 190-250 nm a las temperaturas seleccionadas (4, 10, 25, 37 °C). La velocidad de adquisición fue de 50 nm por minuto. El espectro se obtuvo utilizando cubetas de Cuarzo de 0,1 mm-1 mm. Las determinaciones

de controles se sustrajeron del espectro. Se aplicó una suave reducción de ruido eventualmente cuando fuera necesario utilizando un método binomial. Los datos se expresaron como la elipticidad media residual  $[\theta]$  en  $\text{deg. cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Los gráficos se representaron utilizando el software Origin (Originlab).

Se utilizó dicroísmo circular en los análisis para determinar si la estructura secundaria de p31-43 se encontraba en equilibrio con otras conformaciones. Se utilizó Urea 8M para evaluar el comportamiento de p31-43 en un entorno desnaturalizante. La misma se agregó a soluciones de p31-43 50 y 200  $\mu\text{M}$  que se encontraban a 25 °C (temperatura ambiente). Por otro lado, se realizaron espectros de elipticidad de una solución de p31-43 a 200  $\mu\text{M}$  a la que se le agregaron diferentes proporciones de 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) 10 %, 20%, 30%, 50%v/v y se midieron a 4°C.

## ***12. Microscopía aplicada en estudios biofísicoquímicos***

### **12.1. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)**

Se prepararon soluciones de p31-43 a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  en agua milliQ que se depositaron en una grilla de Cobre (red de 200) recubierta con Formvar. Luego de 5 minutos, el exceso de fluidos se removió y las muestras se marcaron negativamente con 2%v/v de Acetato de Uranilo en agua por 2 minutos. Luego se removió nuevamente el exceso de fluidos y las muestras se secaron. La visualización se realizó utilizando el microscopio JEOLCX II, operando a 100 kV.

### **12.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

Se utilizó un microscopio de AFM en modo “tapping” (Nanoscope V, Bruker, Santa Barbara, CA) para caracterizar la capacidad de auto ensamblarse del péptido, utilizando sondas cargadas con silicona con nitrito (RTESP, Veeco con radios nominales de 8 -12 nm,

271e311 kHz, fuerza constante 20-80 N m<sup>-1</sup>). La velocidad típica del scanner fue de 1Hz. Se depositaron soluciones de péptido p31-43 a concentraciones desde 5, 10, 50 y 100 μM, sobre MICA recién cortada y se dejó que interaccionen con la superficie por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se secaron utilizando un flujo de Nitrógeno. El procesamiento de imágenes y medidas se realizó utilizando el software Nanoscope Analysis 1.1 Software (Bruker).

### ***13. Modelado de la conformación de p31-43 in silico***

El modelado in silico fue un servicio proporcionado por el laboratorio del Dr. Sergio Pantano del Instituto Pasteur de Uruguay. Se desarrollaron simulaciones de dinámicas moleculares a nivel de grano grueso utilizando un campo de fuerza SIRAH. La estructura inicial del péptido p31-43 se asumió inicialmente con una conformación de α-Hélice con los extremos N- y C- terminales considerados zwitteronicos. En el ensayo de simulación de agregación de p31-43 se utilizó un péptido aislado, el cual se simuló durante 500 ns, a concentraciones de sales (NaCl) correspondientes a 150 nM. Luego, cuatro estructuras diferentes se eligieron al azar dentro de esta ventana temporal para ser utilizadas como confórmeros de partida, en los estudios de agregación. 50 copias de estos 4 confórmeros se dispusieron en una caja computacional de solvatación a una distancia mínima de 4 nm entre sus centros de masa y se simularon por 5 μs. Tanto el monómero y las 50 simulaciones se desarrollaron con GROMACS 4.6.7 en NTP ensamble a 310K.

El cálculo de una estructura secundaria se realizó utilizando herramientas SIRAH (Machado y Pantano 2016), mientras que los contactos interpéptido se computaron con G mindist incluido en las herramientas de análisis de GROMACS. Los últimos 100ns de cada simulación se utilizaron para el análisis. La agregación se monitoreo como una

función de la formación y el tamaño de los clusters. Un cluster se definió cuando la distancia entre los dos átomos de diferentes péptidos es menor a 0,4 nm. Se calculó, tal como lo realizó como Kuroda et al. (Kuroda et al. 2016; Kikugawa et al. 2009) un tamaño medio de clusters (MCS) como  $MCS = (\sum_{Ni=1} C_{Si,t}) / N$ . Donde  $C_{Si,t}$  significa el tamaño del cluster al cual pertenece el péptido  $i$  al Manet tiempo  $t$ , y  $N$  es el número total de péptidos en el sistema (50 en este estudio).

#### ***14. Dispersión dinámica de la luz (DLS)***

Se utilizaron dos solución de p31-43 a 125  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$  en agua mili Q. Todas las soluciones del péptido p31-43 se filtraron utilizando un filtro de 200 nm, para eliminar oligómeros grandes, agregados y polvo de la solución. Las medidas se realizaron por triplicado, utilizando un equipo Zetasizer(Nano-ZS) proveniente de Malvern Instruments. El análisis de la función de correlación obtenida se realizó utilizando el software “Dispersion Technology Software” (DTS) de Malvern.

#### ***15. Determinación de agregados en solución utilizando la sonda BODIPY***

Se utilizó una sonda BODIPY sintetizada y caracterizada por Nicolo Tonelli (Smith et al. 2010), quien amablemente nos la donó para realizar estos ensayos. La sonda se encuentra conjugada a Triazol y posee la capacidad de unirse a oligómeros solubles de péptidos y cambiar su comportamiento espectroscópico cuando se encuentra unida a oligómeros y fibrillas. En este último caso su fluorescencia medida a 540nm se incrementará al excitar la muestra a 525nm. En los experimentos realizados se utilizaron soluciones de p31-43 de diferentes concentraciones 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  y se utilizó una concentración final de sonda de 1  $\mu\text{M}$ . Las medidas se realizaron utilizando un



*Materiales y métodos*

Fluorómetro JASCO FP6300 y el análisis de datos se realizó utilizando el software OriginLab.



# ANEXOS



# Anexo

## 1. Nomenclatura de aminoácidos

Aminoácidos	Código de una letra	Código de tres letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Aspartato	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

## ***2. Composición de soluciones utilizadas***

### ***2.1. Buffer Krebs base (1000mL)***

- 69 g NaCl (145nM)
- 3,5 g KCl
- 1,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2.9 g MgSO<sub>4</sub> anhidro
- 20,8 g NaHCO<sub>3</sub>
- Completar con agua milliQ hasta llegar a 1 litro. Llevar a pH:7,2.

#### ***2.1.1. Solución KRB (1000mL)***

- 90mL 10X Buffer Krebs base.
- 10mL 10X CaCl<sub>2</sub>.
- 900 mL Agua milliQ.

#### ***2.1.2. KRB 1X + Glucosa 10mM:***

- 180 mg Glucosa
- 100mL solución Krebs.

#### ***2.1.3. KRB 1X + Manitol 10mM:***

- 180mg Manitol Mannitol 180 mg
- 100mL solución KRB.

### ***2.2. Medio RPMI completo (1000mL)***

- 100mL (10 %v/v) Suero fetal bovino inactivado, Gibco.
- 10ml (1 %v/v) L-Glutamina. Stock: Glutamax-1, 100X, Gibco.
- 10mL (1 %v/v) Penicilina/Streptomicina (1000 IU, 1000 µg/mL).
- 10 mL (1 %v/v) Aminoácidos no esenciales- stock: MEMNEAA, 100X, Gibco.
- 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub> bicarbonato de sodio (Sigma).
- 880 mL RPMI 1640 comercial, Gibco.

### 2.3. Medio RPMI enriquecido (1000mL)

- 100mL (10 %v/v) Suero fetal bovino inactivado por calor, Gibco.
- 10mL (1 %v/v) L-Glutamina. Stock: Glutamax-1, 100 X, Gibco.
- 10mL (1%v/v) Penicilina/Streptomycin (1000 IU, 1000 µg/mL), Gibco.
- 10 mL (1 %v/v) Aminoácidos no esenciales- MEMNEAA (100X) Gibco.
- 10 mL (1 %v/v) HEPES 10mM, stock: HEPES 1M.
- 1 mL (55 µM) 2-β-Mercaptoetanol, Stock: 1000X (55mM)
- 3,7 gr/L, NaHCO<sub>3</sub> bicarbonato de sodio (Sigma).
- 425 mL RPMI 1640 comercial, Gibco.

### 2.4. Medio DMEM completo (1000mL)

- 100mL (10 %v/v) Suero fetal bovino inactivado por calor, Gibco.
- 10mL (1% V/V) Penicilina/ estreptomycin (1000 IU, 1000 µg/mL), Gibco.
- 10mL (1%v/v) L-glutamina. Stock: Glutamax-1, (100 X) Gibco.
- 10mL (1%v/v) Aminoácidos no esenciales. Stock: MEMNEAA (100X) Gibco.
- 50 mg/mL Gentamicina.
- 2 gr/L de NaHCO<sub>3</sub>, bicarbonato de sodio (Sigma).
- 870 mL Dulbecco Modified Eagle's Medium, Gibco.

### 2.5. Buffer Binding (10X)

- 0,1M HEPES, Gibco (pH:7,4)
- 1,4 M NaCl
- 25 mM CaCl<sub>2</sub>

Se debe realizar una solución 1X a partir de la solución 10X utilizando agua milliQ, inmediatamente antes de trabajar.

### 2.6. Buffer FACS (1000mL)

- 10 mL(10%v/v) Azida de Sodio
- 10 gr/L BSA (Sigma)
- 495 mL PBS (Buffer fosfato salino)





# BIBLIOGRAFÍA



# Bibliografía

- \* Abadie, Valérie, Ludvig M. Sollid, Luis B. Barreiro, y Bana Jabri. 2011. "Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis". *Annual Review of Immunology* 29 (1): 493–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-040210-092915>.
- \* Ahmed, Mélika Ben, Nadia Belhadj Hmida, Nicolette Moes, Sophie Buyse, Maha Abdeladhim, Hechmi Louzir, y Nadine Cerf-Bensussan. 2009. "IL-15 Renders Conventional Lymphocytes Resistant to Suppressive Functions of Regulatory T Cells through Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway". *The Journal of Immunology* 182 (11): 6763–70. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801792>.
- \* Allegretti, Yessica L., Constanza Bondar, Luciana Guzman, Eduardo Cueto Rua, Nestor Chopita, Mercedes Fuertes, Norberto W. Zwirner, y Fernando G. Chirido. 2013. "Broad MICA/B Expression in the Small Bowel Mucosa: A Link between Cellular Stress and Celiac Disease". Editado por Karol Sestak. *PLoS ONE* 8 (9): e73658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073658>.
- \* Anderson, Robert P., Pilar Degano, Andrew J. Godkin, Derek P. Jewell, y Adrian V.S. Hill. 2000. "In Vivo Antigen Challenge in Celiac Disease Identifies a Single Transglutaminase-Modified Peptide as the Dominant A-Gliadin T-Cell Epitope". *Nature Medicine* 6 (3): 337–42. <https://doi.org/10.1038/73200>.
- \* Anderson, Valerie L., y Watt W. Webb. 2011. "Transmission Electron Microscopy Characterization of Fluorescently Labelled Amyloid  $\beta$  1-40 and  $\alpha$ -Synuclein Aggregates". *BMC Biotechnology* 11 (diciembre): 125. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-125>.
- \* Araya, Romina E. 2015. "Estudio de la enteropatía inducida por péptidos de gliadinas y ligandos de la inmunidad innata en modelos experimentales". Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- \* Araya, Romina E., María Florencia Gomez Castro, Paula Carasi, Justin L. McCarville, Jennifer Jury, Allan M. Mowat, Elena F. Verdu, y Fernando G. Chirido. 2016. "Mechanisms of Innate Immune Activation by Gluten Peptide P31-43 in Mice". *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 311 (1): G40–49. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00435.2015>.
- \* Araya, Romina E., Jennifer Jury, Constanza Bondar, Elena F. Verdu, y Fernando G. Chirido. 2014. "Intraluminal Administration of Poly I:C Causes an Enteropathy That Is Exacerbated by Administration of Oral Dietary Antigen". Editado por Simon Patrick Hogan. *PLoS ONE* 9 (6): e99236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099236>.
- \* Arentz-Hansen, H., R. Körner, O. Molberg, H. Quarsten, W. Vader, Y. M. Kooy, K. E. Lundin, et al. 2000. "The Intestinal T Cell Response to Alpha-Gliadin in Adult Celiac Disease Is Focused on a Single Deamidated Glutamine Targeted by Tissue Transglutaminase". *The Journal of Experimental Medicine* 191 (4): 603–12.
- \* Baclayon, Marian, Wouter H. Roos, y Gijs J. L. Wuite. 2010. "Sampling Protein Form and Function with the Atomic Force Microscope". *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 9 (8): 1678–88. <https://doi.org/10.1074/mcp.R110.001461>.
- \* Barone, M. Vittoria, Delia Zanzi, Mariantonia Maglio, Merlin Nanayakkara, Sara Santagata, Giuliana Lania, Erasmo Miele, et al. 2011. "Gliadin-Mediated Proliferation and Innate Immune Activation in Celiac Disease Are Due to Alterations in Vesicular Trafficking". Editado por David Holowka. *PLoS ONE* 6 (2): e17039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017039>.
- \* Barone, M. Vittoria, y K. Peter Zimmer. 2016. "Endocytosis and Transcytosis of Gliadin Peptides". *Molecular and Cellular Pediatrics* 3 (1). <https://doi.org/10.1186/s40348-015-0029-z>.
- \* Barone, Maria, Riccardo Troncone, y Salvatore Auricchio. 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): 20518–37. <https://doi.org/10.3390/ijms151120518>.
- \* Barone, Maria Vittoria, Anna Gimigliano, Gabriella Castoria, Giovanni Paoella, Francesco Maurano, Franco Paparo, Maria Maglio, et al. 2007. "Growth Factor-like Activity of Gliadin, an Alimentary Protein: Implications for Coeliac Disease". *Gut* 56 (4): 480–88. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.086637>.
- \* Barone, Maria Vittoria, Merlin Nanayakkara, Giovanni Paoella, Mariantonia Maglio, Virginia Vitale, Raffaele Troiano, Maria Teresa Silvia Ribeco, et al. 2010. "Gliadin Peptide P31-43 Localises to Endocytic Vesicles and Interferes with Their Maturation". Editado por Diane Bassham. *PLoS ONE* 5 (8): e12246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012246>.

- \* Batt, R. M., M. W. Carter, y L. McLean. 1984. “Morphological and biochemical studies of a naturally occurring enteropathy in the Irish setter dog: a comparison with coeliac disease in man”. *Research in Veterinary Science* 37 (3): 339–46. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31875-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31875-7).
- \* Benahmed, Mélíka, Bertrand Meresse, Bertrand Arnulf, Ullah Barbe, Jean-Jacques Mention, Virginie Verkarre, Matthieu Allez, Christophe Cellier, Olivier Hermine, y Nadine Cerf–Bensussan. 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>.
- \* Benson, Andrew K., Scott A. Kelly, Ryan Legge, Fangrui Ma, Soo Jen Low, Jaehyoung Kim, Min Zhang, et al. 2010. “Individuality in Gut Microbiota Composition Is a Complex Polygenic Trait Shaped by Multiple Environmental and Host Genetic Factors”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (44): 18933–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>.
- \* Bethune, Michael T., Juan T. Borda, Erin Ribka, Michael-Xun Liu, Kathrine Phillippi-Falkenstein, Ronald J. Jandacek, Gaby G. M. Doxiadis, Gary M. Gray, Chaitan Khosla, y Karol Sestak. 2008. “A Non-Human Primate Model for Gluten Sensitivity”. *PLOS ONE* 3 (2): e1614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001614>.
- \* Bethune, Michael T., Erin Ribka, Chaitan Khosla, y Karol Sestak. 2008. “Transepithelial Transport and Enzymatic Detoxification of Gluten in Gluten-Sensitive Rhesus Macaques”. *PLOS ONE* 3 (3): e1857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001857>.
- \* Bishop, John B., James C. Martin, y William M. Rosenblum. 1991. “A Light Scattering Method for Qualitatively Monitoring Aggregation Rates in Macromolecular Systems”. *Journal of Crystal Growth* 110 (1–2): 164–70. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(91\)90880-E](https://doi.org/10.1016/0022-0248(91)90880-E).
- \* Black, Kay E., Joseph A. Murray, y Chella S. David. 2002. “HLA-DQ Determines the Response to Exogenous Wheat Proteins: A Model of Gluten Sensitivity in Transgenic Knockout Mice”. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (10): 5595–5600.
- \* Bochicchio, B., A. Pepe, y A. M. Tamburro. 2001. “On (GGLGY) Synthetic Repeating Sequences of Lamprin and Analogous Sequences”. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 20 (4): 243–50.
- \* Bochicchio, Brigida, y Antonio Mario Tamburro. 2002. “Polyproline II Structure in Proteins: Identification by Chiroptical Spectroscopies, Stability, and Functions”. *Chirality* 14 (10): 782–92. <https://doi.org/10.1002/chir.10153>.
- \* Bouziat, Romain, Reinhard Hinterleitner, Judy J. Brown, Jennifer E. Stencel-Baerenwald, Mine Ikizler, Toufic Mayassi, Marlies Meisel, et al. 2017. “Reovirus Infection Triggers Inflammatory Responses to Dietary Antigens and Development of Celiac Disease”. *Science* 356 (6333): 44–50. <https://doi.org/10.1126/science.aah5298>.
- \* Bozzola, John J., y Lonnie Dee Russell. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones & Bartlett Learning.
- \* Brinkman, Brigitta M., Anne Becker, Rene B. Ayiseh, Falk Hildebrand, Jeroen Raes, Geert Huys, y Peter Vandenabeele. 2013. “Gut Microbiota Affects Sensitivity to Acute DSS-Induced Colitis Independently of Host Genotype”. *Inflammatory Bowel Diseases* 19 (12): 2560–67. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182a8759a>.
- \* Burikhanov, Ravshan, Yanming Zhao, Anindya Goswami, Shirley Qiu, Steven R. Schwarze, y Vivek M. Rangnekar. 2009. “The Tumor Suppressor Par-4 Activates an Extrinsic Pathway for Apoptosis”. *Cell* 138 (2): 377–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.022>.
- \* Calvanese, Luisa, Merlin Nanayakkara, Rosita Aitoro, Marina Sanseverino, Anna Lucia Tornesello, Lucia Falcigno, Gabriella D’Auria, y Maria Vittoria Barone. 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): e3161. <https://doi.org/10.1002/psc.3161>.
- \* Campbell, James H., Carmen M. Foster, Tatiana Vishnivetskaya, Alisha G. Campbell, Zamin K. Yang, Ann Wymore, Anthony V. Palumbo, Elissa J. Chesler, y Mircea Podar. 2012. “Host Genetic and Environmental Effects on Mouse Intestinal Microbiota”. *The ISME Journal* 6 (11): 2033–44. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.54>.
- \* Caputo, Ivana, Agnese Secondo, Marilena Lepretti, Gaetana Paoella, Salvatore Auricchio, Maria Vittoria Barone, y Carla Esposito. 2012. “Gliadin Peptides Induce Tissue Transglutaminase Activation and ER-Stress through Ca<sup>2+</sup> Mobilization in Caco-2 Cells”. Editado por Maria Gasset. *PLoS ONE* 7 (9): e45209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045209>.

- \* Cedillos, Rudy Orlando. 2013. “Alpha-Synuclein Aggregates Activate the Nlrp3 Inflammasome Following Vesicle Rupture”. Master, Loyola University Chicago. [http://ecommons.luc.edu/luc\\_theses/1859](http://ecommons.luc.edu/luc_theses/1859).
- \* Choo, Jocelyn M., Paul J. Trim, Lex E. X. Leong, Guy C. J. Abell, Carly Brune, Nicole Jeffries, Steve Wesselingh, T. N. Dear, Marten F. Snel, y Geraint B. Rogers. 2017. “Inbred Mouse Populations Exhibit Intergenerational Changes in Intestinal Microbiota Composition and Function Following Introduction to a Facility”. *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00608>.
- \* Clemente, M. G., S. De Virgiliis, J. S. Kang, R. Macatagney, M. P. Musu, M. R. Di Pierro, S. Drago, M. Congia, y A. Fasano. 2003. “Early Effects of Gliadin on Enterocyte Intracellular Signalling Involved in Intestinal Barrier Function”. *Gut* 52 (2): 218–23.
- \* Compan, Vincent, Alberto Baroja-Mazo, Gloria López-Castejón, Ana I. Gomez, Carlos M. Martínez, Diego Angosto, María T. Montero, et al. 2012. “Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation”. *Immunity* 37 (3): 487–500. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.013>.
- \* Costes, Léa M.M., Bertrand Meresse, Nadine Cerf-Bensussan, y Janneke N. Samsom. 2015. “The Role of Animal Models in Unravelling Therapeutic Targets in Coeliac Disease”. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 29 (3): 437–50. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.04.007>.
- \* Darré, Leonardo, Matías Rodrigo Machado, Astrid Febe Brandner, Humberto Carlos González, Sebastián Ferreira, y Sergio Pantano. 2015. “SIRAH: A Structurally Unbiased Coarse-Grained Force Field for Proteins with Aqueous Solvation and Long-Range Electrostatics”. *Journal of Chemical Theory and Computation* 11 (2): 723–39. <https://doi.org/10.1021/ct5007746>.
- \* De Silvestri, Annalisa, Cristina Capittini, Dimitri Poddighe, Chiara Valsecchi, Gianluigi Marseglia, Sara Carlotta Tagliacarne, Valeria Scotti, et al. 2018. “HLA-DQ Genetics in Children with Celiac Disease: A Meta-Analysis Suggesting a Two-Step Genetic Screening Procedure Starting with HLA-DQ  $\beta$  Chains”. *Pediatric Research* 83 (3): 564–72. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.307>.
- \* Deloris Alexander, A., Roger P. Orcutt, JaNell C. Henry, Joseph Baker, Anika C. Bissahoyo, y David W. Threadgill. 2006. “Quantitative PCR Assays for Mouse Enteric Flora Reveal Strain-Dependent Differences in Composition That Are Influenced by the Microenvironment”. *Mammalian Genome* 17 (11): 1093–1104. <https://doi.org/10.1007/s00335-006-0063-1>.
- \* Di Pisa, Margherita, Gérard Chassaing, y Jean-Marie Swiecicki. 2015. “Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers”. *Biochemistry* 54 (2): 194–207. <https://doi.org/10.1021/bi501392n>.
- \* Di Sabatino, Antonio, Karen M. Pickard, John N. Gordon, Virginia Salvati, Giuseppe Mazzarella, Robert M. Beattie, Anna Vossenkaemper, et al. 2007. “Evidence for the Role of Interferon- $\alpha$  Production by Dendritic Cells in the Th1 Response in Celiac Disease”. *Gastroenterology* 133 (4): 1175–87. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.018>.
- \* Diosdado, B., E. Oort Van, y C. Wijmenga. 2005. “‘Coelionomics’: Towards Understanding the Molecular Pathology of Coeliac Disease.” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 43 (7): 685–95. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.117>.
- \* Dodero, Veronica Isabel. 2011. “Biomolecular Studies by Circular Dichroism”. *Frontiers in Bioscience* 16 (1): 61. <https://doi.org/10.2741/3676>.
- \* Dufrière, Yves F., Toshio Ando, Ricardo Garcia, David Alsteens, David Martinez-Martin, Andreas Engel, Christoph Gerber, y Daniel J. Müller. 2017. “Imaging Modes of Atomic Force Microscopy for Application in Molecular and Cell Biology”. *Nature Nanotechnology* 12 (4): 295–307. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>.
- \* Eaton, Peter, y Paul West. 2010. *Atomic Force Microscopy*. Oxford University Press.
- \* Ericsson, Aaron C., J. Wade Davis, William Spollen, Nathan Bivens, Scott Givan, Catherine E. Hagan, Mark McIntosh, y Craig L. Franklin. 2015. “Effects of Vendor and Genetic Background on the Composition of the Fecal Microbiota of Inbred Mice”. *PLOS ONE* 10 (2): e0116704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116704>.
- \* Erni, Rolf, Marta D. Rossell, Christian Kisielowski, y Ulrich Dahmen. 2009. “Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe”. *Physical Review Letters* 102 (9): 096101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.102.096101>.
- \* Escudero-Hernández, Celia, Amado Salvador Peña, y David Bernardo. 2016. “Immunogenetic Pathogenesis of Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity”. *Current Gastroenterology Reports* 18 (7): 36. <https://doi.org/10.1007/s11894-016-0512-2>.
- \* Flecknell, Paul. 2015. *Laboratory Animal Anaesthesia*. Academic Press.

- \* Forrester, Steven J., Daniel S. Kikuchi, Marina S. Hernandez, Qian Xu, y Kathy K. Griendling. 2018. “Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling”. *Circulation Research* 122 (6): 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>.
- \* Freitag, Tobias L., Svend Rietdijk, Yvonne Junker, Yury Popov, Atul K. Bhan, Ciaran P. Kelly, Cox Terhorst, y Detlef Schuppan. 2009. “Gliadin-primed CD4+CD45RB<sup>low</sup>CD25<sup>-</sup> T cells drive gluten-dependent small intestinal damage after adoptive transfer into lymphopenic mice”. *Gut* 58 (12): 1597–1605. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.186361>.
- \* Frisch, S. M., y H. Francis. 1994. “Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis”. *The Journal of Cell Biology* 124 (4): 619–26.
- \* Frossi, Barbara, Claudio Tripodo, Carla Guarnotta, Antonio Carroccio, Marco De Carli, Stefano De Carli, Marco Marino, Antonino Calabrò, y Carlo E. Pucillo. 2017. “Mast Cells Are Associated with the Onset and Progression of Celiac Disease”. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (4): 1266–1274.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.011>.
- \* Galipeau, Heather J., Justin L. McCarville, Sina Huebener, Owen Litwin, Marlies Meisel, Bana Jabri, Yolanda Sanz, et al. 2015. “Intestinal Microbiota Modulates Gluten-Induced Immunopathology in Humanized Mice”. *The American Journal of Pathology* 185 (11): 2969–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.018>.
- \* Galipeau, Heather J., Nestor E. Rulli, Jennifer Jury, Xianxi Huang, Romina Araya, Joseph A. Murray, Chella S. David, Fernando G. Chirido, Kathy D. McCoy, y Elena F. Verdu. 2011. “Sensitization to Gliadin Induces Moderate Enteropathy and Insulinitis in Nonobese Diabetic-DQ8 Mice”. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (8): 4338–46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100854>.
- \* Gerace, Elisabetta, Francesco Resta, Elisa Landucci, Daniela Renzi, Alessio Masi, Domenico E. Pellegrini-Giampietro, Antonio Calabrò, y Guido Mannaioni. 2017. “The Gliadin Peptide 31–43 Exacerbates Kainate Neurotoxicity in Epilepsy Models”. *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14845-4>.
- \* Gilbert, Simon M, Nikolaus Wellner, Peter S Belton, Julia A Greenfield, Giuliano Siligardi, Peter R Shewry, y Arthur S Tatham. 2000. “Expression and characterisation of a highly repetitive peptide derived from a wheat seed storage protein”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1479 (1): 135–46. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00059-5).
- \* Giovannini, C, M Sanchez, E Straface, B Scazzocchio, M Silano, y M De Vincenzi. 2000. “Induction of Apoptosis in Caco-2 Cells by Wheat Gliadin Peptides”. *Toxicology* 145 (1): 63–71. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00223-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00223-1).
- \* Giovannini, Claudio, Paola Matarrese, Beatrice Scazzocchio, Rosaria Vari, Massimo D’Archivio, Elisabetta Straface, Roberta Masella, Walter Malorni, y Massimo De Vincenzi. 2003. “Wheat Gliadin Induces Apoptosis of Intestinal Cells via an Autocrine Mechanism Involving Fas-Fas Ligand Pathway”. *FEBS Letters* 540 (1–3): 117–24. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00236-9).
- \* Godkin, A. 1997. “Use of Eluted Peptide Sequence Data to Identify the Binding Characteristics of Peptides to the Insulin-Dependent Diabetes Susceptibility Allele HLA-DQ8 (DQ 3.2)”. *International Immunology* 9 (6): 905–11. <https://doi.org/10.1093/intimm/9.6.905>.
- \* Gómez Castro, María Florencia, Emanuel Miculán, María Georgina Herrera, Carolina Ruera, Federico Perez, Eduardo Daniel Prieto, Exequiel Barrera, Sergio Pantano, Paula Carasi, y Fernando Gabriel Chirido. 2019. “P31-43 Gliadin Peptide Forms Oligomers and Induces NLRP3 Inflammasome/Caspase 1- Dependent Mucosal Damage in Small Intestine”. *Frontiers in Immunology* 10 (enero). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00031>.
- \* Gómez, Diana M, Silvio Urcuqui-Inchima, y Juan C Hernandez. 2017. “Silica Nanoparticles Induce NLRP3 Inflammasome Activation in Human Primary Immune Cells”. *Innate Immunity* 23 (8): 697–708. <https://doi.org/10.1177/1753425917738331>.
- \* Green, Peter H. R., y Bana Jabri. 2006. “Celiac Disease”. *Annual Review of Medicine* 57: 207–21. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.051804.122404>.
- \* H., Bajka B., Gillespie C. M., Steeb C.-B., Read L. C., y Howarth G. S. 2003. “Applicability of the Ussing Chamber Technique to Permeability Determinations in Functionally Distinct Regions of the Gastrointestinal Tract in the Rat”. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 38 (7): 732–41. <https://doi.org/10.1080/00365520310003101>.
- \* Hall, E. J., S. D. Carter, A. Barnes, y R. M. Batt. 1992. “Immune responses to dietary antigens in gluten-sensitive enteropathy of Irish setters”. *Research in Veterinary Science* 53 (3): 293–99. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90129-P](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90129-P).

- \* Hausch, Felix, Lu Shan, Nilda A. Santiago, Gary M. Gray, y Chaitan Khosla. 2002. “Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides”. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 283 (4): G996–1003. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00136.2002>.
- \* Hayat, M. A. 2000. *Principles and Techniques Electron Microscopy Biological Applications 4th Edition | Biological Imaging*. <https://www.cambridge.org/gb/academic/subjects/life-sciences/biological-imaging/principles-and-techniques-electron-microscopy-biological-applications-4th-edition>, <https://www.cambridge.org/gb/academic/subjects/life-sciences/biological-imaging/principles-and-techniques-electron-microscopy-biological-applications-4th-edition>.
- \* Hedrich, Hans J., y Gillian R. Bullock, eds. 2004. *The Laboratory Mouse*. The Handbook of Experimental Animals. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- \* Henderson, Kate N., Jason A. Tye-Din, Hugh H. Reid, Zhenjun Chen, Natalie A. Borg, Tim Beissbarth, Arthur Tatham, et al. 2007. “A Structural and Immunological Basis for the Role of Human Leukocyte Antigen DQ8 in Celiac Disease”. *Immunity* 27 (1): 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.015>.
- \* Hernández, Félix, Tobias Engel, Alberto Gómez-Ramos, Mar Pérez, y Jesús Avila. 2005. “Characterization of Alzheimer Paired Helical Filaments by Electron Microscopy”. *Microscopy Research and Technique* 67 (3–4): 121–25. <https://doi.org/10.1002/jemt.20194>.
- \* Herrera, M. G., L. A. Benedini, C. Lonz, P. L. Schilardi, T. Hellweg, J.-M. Ruyschaert, y V. I. Dodero. 2015. “Self-Assembly of 33-Mer Gliadin Peptide Oligomers”. *Soft Matter* 11 (44): 8648–60. <https://doi.org/10.1039/C5SM01619C>.
- \* Horne, Rachael, James St. Pierre, Sufian Odeh, Michael Surette, y Jane A. Foster. 2019. “Microbe and Host Interaction in Gastrointestinal Homeostasis”. *Psychopharmacology*, marzo. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05218-y>.
- \* Hornung, Veit, Franz Bauernfeind, Annett Halle, Eivind O Samstad, Hajime Kono, Kenneth L Rock, Katherine A Fitzgerald, y Eicke Latz. 2008. “Silica Crystals and Aluminum Salts Activate the NALP3 Inflammasome through Phagosomal Destabilization”. *Nature Immunology* 9 (8): 847–56. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>.
- \* Hoy, Yana Emmy, Elisabeth M. Bik, Trevor D. Lawley, Susan P. Holmes, Denise M. Monack, Julie A. Theriot, y David A. Relman. 2015. “Variation in Taxonomic Composition of the Fecal Microbiota in an Inbred Mouse Strain across Individuals and Time”. *PLOS ONE* 10 (11): e0142825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142825>.
- \* Hüe, Sophie, Jean-Jacques Mention, Renato C. Monteiro, ShaoLing Zhang, Christophe Cellier, Jacques Schmitz, Virginie Verkarre, et al. 2004. “A Direct Role for NKG2D/MICA Interaction in Villous Atrophy during Celiac Disease”. *Immunity* 21 (3): 367–77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.018>.
- \* Hug, Martin J. 2011. “Transepithelial Measurements Using the Ussing Chamber”, 11. <https://www.researchgate.net/publication/267820890>.
- \* Hunt, K. A., A. Zhernakova, G. Turner, G. A. Heap, L. Franke, M. Bruinenberg, J. Romanos, et al. 2008. “Newly Identified Genetic Risk Variants for Celiac Disease Related to the Immune Response.” *Nature Genetics* 40 (4): 395–402. <https://doi.org/10.1038/ng.102>.
- \* Husby, Steffen, y Joseph A. Murray. 2014. “Diagnosing Coeliac Disease and the Potential for Serological Markers”. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 11 (11): 655–63. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.162>.
- \* Iacomino, Giuseppe, Olga Fierro, Sabato D’Auria, Gianluca Picariello, Pasquale Ferranti, Claudia Liguori, Francesco Addeo, y Gianfranco Mamone. 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): 1088–96. <https://doi.org/10.1021/jf3045523>.
- \* Iacomino, Giuseppe, Angela Marano, Ilaria Stillitano, Vera Rotondi Aufiero, Gaetano Iaquinto, Michele Schettino, Armando Masucci, Riccardo Troncone, Salvatore Auricchio, y Giuseppe Mazzarella. 2016. “Celiac Disease: Role of Intestinal Compartments in the Mucosal Immune Response”. *Molecular and Cellular Biochemistry* 411: 341–49. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2596-7>.
- \* “Intraluminal Administration of Poly I:C Causes an Enteropathy That Is Exacerbated by Administration of Oral Dietary Antigen”. s. f.
- \* Jayaraman, Murali, Ashwani K. Thakur, Karunakar Kar, Ravindra Kodali, y Ronald Wetzel. 2011. “Assays for Studying Nucleated Aggregation of Polyglutamine Proteins”. *Methods (San Diego, Calif)* 53 (3): 246–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.01.001>.

- \* Jiron, Jessica M, Jorge L Mendieta Calle, Evelyn J Castillo, Abel M Abraham, Jonathan G Messer, Wendi L Malphurs, Carolyn Malinowski, et al. 2019. “Comparison of Isoflurane, Ketamine–Dexmedetomidine, and Ketamine–Xylazine for General Anesthesia during Oral Procedures in Rice Rats (*Oryzomys Palustris*)”. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 58 (1): 40–49. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000032>.
- \* Johansen, B. H., F. Vartdal, J. A. Eriksen, E. Thorsby, y L. M. Sollid. 1996. “Identification of a Putative Motif for Binding of Peptides to HLA-DQ2”. *International Immunology* 8 (2): 177–82.
- \* Junker, Yvonne, Sebastian Zeissig, Seong-Jun Kim, Donatella Barisani, Herbert Wieser, Daniel A. Leffler, Victor Zavallos, et al. 2012. “Wheat Amylase Trypsin Inhibitors Drive Intestinal Inflammation via Activation of Toll-like Receptor 4”. *The Journal of Experimental Medicine* 209 (13): 2395–2408. <https://doi.org/10.1084/jem.20102660>.
- \* Kahrs, Christian R., Katerina Chuda, German Tapia, Lars C. Stene, Karl Mårild, Trond Rasmussen, Kjersti S. Rønningen, et al. 2019. “Enterovirus as Trigger of Coeliac Disease: Nested Case-Control Study within Prospective Birth Cohort”. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 364 (febrero): 1231. <https://doi.org/10.1136/bmj.1231>.
- \* Karell, Kati, Andrew S Louka, Simon J Moodie, Henry Ascher, Fabienne Clot, Luigi Greco, Paul J Ciclitira, Ludvig M Sollid, y Jukka Partanen. 2003. “Hla types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the european genetics cluster on celiac disease”. *Human Immunology* 64 (4): 469–77. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(03\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(03)00027-2).
- \* Kasarda, Donald D., John E. Bernardin, y William. Gaffield. 1968. “Circular dichroism and optical rotatory dispersion of  $\alpha$ -gliadin”. *Biochemistry* 7 (11): 3950–57. <https://doi.org/10.1021/bi00851a023>.
- \* Kauwe, Andrea L. de, Zhenjun Chen, Robert P. Anderson, Catherine L. Keech, Jason D. Price, Odilia Wijburg, David C. Jackson, Jodi Ladhams, Janette Allison, y James McCluskey. 2009. “Resistance to Celiac Disease in Humanized HLA-DR3-DQ2-Transgenic Mice Expressing Specific Anti-Gliadin CD4+ T Cells”. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (12): 7440–50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900233>.
- \* Kayagaki, Nobuhiko, Irma B. Stowe, Bettina L. Lee, Karen O’Rourke, Keith Anderson, Søren Warming, Trinna Cuellar, et al. 2015. “Caspase-11 Cleaves Gasdermin D for Non-Canonical Inflammasome Signalling”. *Nature* 526 (7575): 666–71. <https://doi.org/10.1038/nature15541>.
- \* Kikugawa, Gota, Rossen Apostolov, Narutoshi Kamiya, Makoto Taiji, Ryutaro Himeno, Haruki Nakamura, y Yasushige Yonezawa. 2009. “Application of MDGRAPE-3, a Special Purpose Board for Molecular Dynamics Simulations, to Periodic Biomolecular Systems”. *Journal of Computational Chemistry* 30 (1): 110–18. <https://doi.org/10.1002/jcc.21035>.
- \* Kim, Chu-Young, Hanne Quarsten, Elin Bergseng, Chaitan Khosla, y Ludvig M. Sollid. 2004. “Structural Basis for HLA-DQ2-Mediated Presentation of Gluten Epitopes in Celiac Disease”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (12): 4175–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306885101>.
- \* Kim, Sangman Michael, Toufic Mayassi, y Bana Jabri. 2015. “Innate Immunity: Actuating the Gears of Celiac Disease Pathogenesis”. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 29 (3): 425–35. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.05.001>.
- \* Kovacs, Amir, Noa Ben-Jacob, Hanna Tayem, Eran Halperin, Fuad A. Iraqi, y Uri Gophna. 2011. “Genotype Is a Stronger Determinant than Sex of the Mouse Gut Microbiota”. *Microbial Ecology* 61 (2): 423–28. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9787-2>.
- \* Kuroda, Yutaka, Atsushi Suenaga, Yuji Sato, Satoshi Kosuda, y Makoto Taiji. 2016. “All-Atom Molecular Dynamics Analysis of Multi-Peptide Systems Reproduces Peptide Solubility in Line with Experimental Observations”. *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep19479>.
- \* Last, Julie A., Paul Russell, Paul F. Nealey, y Christopher J. Murphy. 2010. “The Applications of Atomic Force Microscopy to Vision Science”. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (12): 6083–94. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5470>.
- \* Lebreton, Corinne, Sandrine Ménard, Juliette Abed, Ivan Cruz Moura, Rosanna Coppo, Christophe Dugave, Renato C. Monteiro, et al. 2012. “Interactions Among Secretory Immunoglobulin A, CD71, and Transglutaminase-2 Affect Permeability of Intestinal Epithelial Cells to Gliadin Peptides”. *Gastroenterology* 143 (3): 698-707.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.051>.
- \* Leibold, Benjamin, Jonas F Ludvigsson, y Peter H R Green. 2015. “Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity”. *BMJ*, octubre, h4347. <https://doi.org/10.1136/bmj.h4347>.



- \* Lim, So Dug, Hyemin Min, Esther Youn, Ichiro Kawasaki, y Yhong-Hee Shim. 2018. “Gliadin Intake Induces Oxidative-Stress Responses in *Caenorhabditis Elegans*”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (3): 2139–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.002>.
- \* Liu, Huawei, Ruiying Xu, Qingyu Kong, Jiling Liu, Zhen Yu, y Cuifen Zhao. 2017. “Downregulated NLRP3 and NLRP1 Inflammasomes Signaling Pathways in the Development and Progression of Type 1 Diabetes Mellitus”. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 94 (octubre): 619–26. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.102>.
- \* Lopes, Jose L. S., Andrew J. Miles, Lee Whitmore, y B. A. Wallace. 2014. “Distinct Circular Dichroism Spectroscopic Signatures of Polyproline II and Unordered Secondary Structures: Applications in Secondary Structure Analyses: Polyproline II and Disordered CD Spectra”. *Protein Science* 23 (12): 1765–72. <https://doi.org/10.1002/pro.2558>.
- \* Lu, Zhexue, Zhiling Zhang, y Daiwen Pang. 2005. “Atomic Force Microscopy in Cell Biology”. *Chinese Science Bulletin* 50 (14): 1409. <https://doi.org/10.1360/982004-843>.
- \* Luciani, A., V. R. Villella, A. Vasaturo, I. Giardino, M. Pettoello-Mantovani, S. Guido, O. N. Cexus, et al. 2010. “Lysosomal Accumulation of Gliadin P31-43 Peptide Induces Oxidative Stress and Tissue Transglutaminase-Mediated PPAR Downregulation in Intestinal Epithelial Cells and Coeliac Mucosa”. *Gut* 59 (3): 311–19. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.183608>.
- \* Lundin, Knut E.A., y Ludvig M. Sollid. 2014. “Advances in Coeliac Disease”. *Current Opinion in Gastroenterology* 30 (2): 154–62. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000041>.
- \* Machado, Matías R., y Sergio Pantano. 2016. “SIRAH Tools: Mapping, Backmapping and Visualization of Coarse-Grained Models”. *Bioinformatics* 32 (10): 1568–70. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw020>.
- \* Maiuri, Luigi, Carolina Ciacci, Ida Ricciardelli, Loredana Vacca, Valeria Raia, Salvatore Auricchio, Jean Picard, Mohamed Osman, Sonia Quaratino, y Marco Londei. 2003. “Association between Innate Response to Gliadin and Activation of Pathogenic T Cells in Coeliac Disease”. *The Lancet* 362 (9377): 30–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13803-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13803-2).
- \* Maiuri, Luigi, Valeria R Villella, Mauro Piacentini, Valeria Raia, y Guido Kroemer. 2019. “Defective Proteostasis in Celiac Disease as a New Therapeutic Target”. *Cell Death & Disease* 10 (2): 114. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1392-9>.
- \* Mamone, Gianfranco, Pasquale Ferranti, Mauro Rossi, Peter Roepstorff, Olga Fierro, Antonio Malorni, y Francesco Addeo. 2007. “Identification of a peptide from  $\alpha$ -gliadin resistant to digestive enzymes: Implications for celiac disease”. *Journal of Chromatography B*, 44th Scientific Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, 855 (2): 236–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.009>.
- \* Mandile, R., S. Picascia, C. Parrella, A. Camarca, M. Gobetti, L. Greco, R. Troncone, C. Gianfrani, y R. Auricchio. 2017. “Lack of Immunogenicity of Hydrolysed Wheat Flour in Patients with Coeliac Disease after a Short-Term Oral Challenge”. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 46 (4): 440–46. <https://doi.org/10.1111/apt.14175>.
- \* Marietta, Eric, Kay Black, Michael Camilleri, Patricia Krause, Roy S. Rogers, Chella David, Mark R. Pittelkow, y Joseph A. Murray. 2004. “A New Model for Dermatitis Herpetiformis That Uses HLA-DQ8 Transgenic NOD Mice”. *The Journal of Clinical Investigation* 114 (8): 1090–97. <https://doi.org/10.1172/JCI21055>.
- \* Marietta, Eric V., y Joseph A. Murray. 2012. “Animal Models to Study Gluten Sensitivity”. *Seminars in Immunopathology* 34 (4): 497–511. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0315-y>.
- \* Marsh, M. N. 1992. “Gluten, Major Histocompatibility Complex, and the Small Intestine. A Molecular and Immunobiologic Approach to the Spectrum of Gluten Sensitivity ('celiac Sprue')”. *Gastroenterology* 102 (1): 330–54.
- \* Marsh, M. N., y P. T. Crowe. 1995. “Morphology of the Mucosal Lesion in Gluten Sensitivity”. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 9 (2): 273–93.
- \* Matysiak-Budnik, Tamara, Ivan Cruz Moura, Michelle Arcos-Fajardo, Corinne Lebreton, Sandrine Ménard, Céline Candalh, Karima Ben-Khalifa, et al. 2008. “Secretory IgA Mediates Retrotranscytosis of Intact Gliadin Peptides via the Transferrin Receptor in Celiac Disease”. *Journal of Experimental Medicine* 205 (1): 143–54. <https://doi.org/10.1084/jem.20071204>.
- \* Mazumdar, Kaushiki, Xavier Alvarez, Juan T. Borda, Jason Dufour, Edith Martin, Michael T. Bethune, Chaitan Khosla, y Karol Sestak. 2010. “Visualization of Transepithelial Passage of the Immunogenic 33-

- Residue Peptide from  $\alpha$ -2 Gliadin in Gluten-Sensitive Macaques”. *PLOS ONE* 5 (4): e10228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010228>.
- \* Mazzarella, Giuseppe, Rosita Stefanile, Alessandra Camarca, Paolo Giliberti, Elena Cosentini, Caterina Marano, Gaetano Iaquinto, et al. 2008. “Gliadin Activates HLA Class I-Restricted CD8+ T Cells in Celiac Disease Intestinal Mucosa and Induces the Enterocyte Apoptosis”. *Gastroenterology* 134 (4): 1017–27. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.008>.
  - \* Meresse, Bertrand, Georgia Malamut, y Nadine Cerf-Bensussan. 2012. “Celiac Disease: An Immunological Jigsaw”. *Immunity* 36 (6): 907–19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.006>.
  - \* Miranda, J. J. L., Peter De Wulf, Peter K. Sorger, y Stephen C. Harrison. 2005. “The Yeast DASH Complex Forms Closed Rings on Microtubules”. *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (2): 138–43. <https://doi.org/10.1038/nsmb896>.
  - \* Mitoma, Hiroki, Shino Hanabuchi, Taeil Kim, Musheng Bao, Zhiqiang Zhang, Naoshi Sugimoto, y Yong-Jun Liu. 2013. “The DHX33 RNA Helicase Senses Cytosolic RNA and Activates the NLRP3 Inflammasome”. *Immunity* 39 (1): 123–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.001>.
  - \* Molberg, Øyvind, Stephen N. Mcadam, Roman Körner, Hanne Quarsten, Christel Kristiansen, Lars Madsen, Lars Fugger, et al. 1998. “Tissue Transglutaminase Selectively Modifies Gliadin Peptides That Are Recognized by Gut-Derived T Cells in Celiac Disease”. *Nature Medicine* 4 (6): 713. <https://doi.org/10.1038/nm0698-713>.
  - \* Monguzzi, Erika, Laura Marabini, Luca Elli, Valentina Vaira, Stefano Ferrero, Francesca Ferretti, Federica Branchi, et al. 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>.
  - \* Monteleone, G, S L F Pender, E Alstead, A C Hauer, P Lionetti, y T T MacDonald. 2001. “Role of Interferon in Promoting T Helper Cell Type 1 Responses in the Small Intestine in Coeliac Disease”, 13.
  - \* Moretti, Sarah, Simona Mrakic-Sposta, Leda Roncoroni, Alessandra Vezzoli, Cinzia Dellanocce, Erika Monguzzi, Federica Branchi, et al. 2018. “Oxidative Stress as a Biomarker for Monitoring Treated Celiac Disease”. *Clinical and Translational Gastroenterology* 9 (6): e157. <https://doi.org/10.1038/s41424-018-0031-6>.
  - \* Moss, S F, L Attia, J V Scholes, J R Walters, y P R Holt. 1996. “Increased Small Intestinal Apoptosis in Coeliac Disease.” *Gut* 39 (6): 811–17. <https://doi.org/10.1136/gut.39.6.811>.
  - \* Murakami, Tomohiko, Johan Ockinger, Jiujiu Yu, Vanessa Byles, Aisleen McColl, Aldebaran M. Hofer, y Tiffany Horng. 2012. “Critical Role for Calcium Mobilization in Activation of the NLRP3 Inflammasome”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (28): 11282–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109>.
  - \* Nanayakkara, Merlin, Giuliana Lania, Mariantonia Maglio, Renata Auricchio, Cristiana De Musis, Valentina Discepolo, Erasmo Miele, et al. 2018. “P31–43, an Undigested Gliadin Peptide, Mimics and Enhances the Innate Immune Response to Viruses and Interferes with Endocytic Trafficking: A Role in Celiac Disease”. *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28830-y>.
  - \* Oberhuber, G. 2000. “Histopathology of Celiac Disease”. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 54 (7): 368–72. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)80003-2).
  - \* O’Connor, Eibhlís M., Eileen A. O’Herlihy, y Paul W. O’Toole. 2014. “Gut Microbiota in Older Subjects: Variation, Health Consequences and Dietary Intervention Prospects”. *Proceedings of the Nutrition Society* 73 (4): 441–51. <https://doi.org/10.1017/S0029665114000597>.
  - \* Ohta, Noriyuki, Takachika Hiroi, Mi-Na Kweon, Naotoshi Kinoshita, Myoung Ho Jang, Tadashi Mashimo, Jun-Ichi Miyazaki, y Hiroshi Kiyono. 2002. “IL-15-Dependent Activation-Induced Cell Death-Resistant Th1 Type CD8 $\alpha$  $\beta$ +NK1.1+ T Cells for the Development of Small Intestinal Inflammation”. *The Journal of Immunology* 169 (1): 460–68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.460>.
  - \* Olausson, R. W., F. E. Johansen, K. E. A. Lundin, J. Jahnsen, P. Brandtzaeg, y I. N. Farstad. 2002. “Interferon- $\gamma$ -Secreting T Cells Localize to the Epithelium in Coeliac Disease”. *Scandinavian Journal of Immunology* 56 (6): 652–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01195.x>.
  - \* Osborne. 1924. “The Vegetable Proteins. By Thomas B. Osborne. Pp. Xiii+154. 2nd Edition. Monographs on Biochemistry. London: Longmans Green and Co. 1924. Pric 9s. Net”. *Journal of the Society of Chemical Industry* 43 (17): 440–440. <https://doi.org/10.1002/jctb.5000431704>.
  - \* Palová-Jelínková, Lenka, Klára Dáňová, Hana Drašarová, Miloš Dvořák, David P. Funda, Petra Fundová, Anna Kotrbová-Kozak, et al. 2013. “Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1 $\beta$  via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF-KB Signaling Pathway and an NLRP3

- Inflammasome Activation”. Editado por Yolanda Sanz. *PLoS ONE* 8 (4): e62426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062426>.
- \* Paolella, Gaetana, Marilena Lepretti, Maria Vittoria Barone, Merlin Nanayakkara, Marina Di Zenzo, Daniele Sblattero, Salvatore Auricchio, Carla Esposito, y Ivana Caputo. 2017. “Celiac Anti-Type 2 Transglutaminase Antibodies Induce Differential Effects in Fibroblasts from Celiac Disease Patients and from Healthy Subjects”. *Amino Acids* 49 (3): 541–50. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2307-z>.
  - \* Paolella, Gaetana, Marilena Lepretti, Stefania Martucciello, Merlin Nanayakkara, Salvatore Auricchio, Carla Esposito, Maria Vittoria Barone, y Ivana Caputo. 2018. “The Toxic Alpha-Gliadin Peptide 31-43 Enters Cells without a Surface Membrane Receptor: Searching for a Receptor for Gliadin Peptide 31-43”. *Cell Biology International* 42 (1): 112–20. <https://doi.org/10.1002/cbin.10874>.
  - \* Parry, Traci L., Jason H. Melehan, Mark J. Ranek, y Monte S. Willis. 2015. “Functional Amyloid Signaling via the Inflammasome, Necrosome, and Signalosome: New Therapeutic Targets in Heart Failure”. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2 (mayo). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2015.00025>.
  - \* Pepe, Antonietta, y Brigida Bochicchio. 2013. “An Elastin-Derived Self-Assembling Polypeptide”. Research article. *Journal of Soft Matter*. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/732157>.
  - \* Pérez, Salvador, Raquel Taléns-Visconti, Sergio Rius-Pérez, Isabela Finamor, y Juan Sastre. 2017. “Redox Signaling in the Gastrointestinal Tract”. *Free Radical Biology and Medicine* 104 (marzo): 75–103. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.048>.
  - \* Perry, Andrea K, Gang Chen, Dahai Zheng, Hong Tang, y Genhong Cheng. 2005. “The Host Type I Interferon Response to Viral and Bacterial Infections”. *Cell Research* 15 (6): 407–22. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290309>.
  - \* Polvi, A., O. A. Garden, C. M. Elwood, S. H. Sørensen, R. M. Batt, M. Mäki, y J. Partanen. 1997. “Canine Major Histocompatibility Complex Genes DQA and DQB in Irish Setter Dogs”. *Tissue Antigens* 49 (3): 236–43. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1997.tb02744.x>.
  - \* Potten, C. S. 1975. “Kinetics and Possible Regulation of Crypt Cell Populations under Normal and Stress Conditions.” *Bulletin Du Cancer* 62 (4): 419–30. <http://europepmc.org/abstract/MED/1212526>.
  - \* Pré, M. Fleur du, Anne E. Kozijn, Lisette A. van Berkel, Mariëtte N. D. ter Borg, Dicky J. Lindenbergh-Kortleve, Lise Torp Jensen, Yvonne M. C. Kooy-Winkelaar, et al. 2011. “Tolerance to ingested deamidated gliadin in mice is maintained by splenic, type 1 regulatory T cells.” *Gastroenterology* 141 (2): 610–20. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.048>.
  - \* Ráki, M, A-C Røberg Beitnes, K E A Lundin, J Jahnsen, F L Jahnsen, y L M Sollid. 2013. “Plasmacytoid Dendritic Cells Are Scarcely Represented in the Human Gut Mucosa and Are Not Recruited to the Celiac Lesion”. *Mucosal Immunology* 6 (5): 985–92. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.136>.
  - \* Ray, Paul D., Bo-Wen Huang, y Yoshiaki Tsuji. 2012. “Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling”. *Cellular Signalling* 24 (5): 981–90. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
  - \* Re, Fabio. 2011. “Inflammasome Activation by Pathogenic Crystals and Particles”. En *The Inflammasomes*, editado por Isabelle Couillin, Virginie Pétrilli, y Fabio Martinon, 85–99. Basel: Springer Basel. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0148-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0148-5_6).
  - \* Rivabene, Roberto, Elena Mancini, y Massimo De Vincenzi. 1999. “In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1453 (1): 152–60. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(98\)00095-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00095-7).
  - \* Roccatano, Danilo, Giorgio Colombo, Marco Fioroni, y Alan E. Mark. 2002. “Mechanism by Which 2,2,2-Trifluoroethanol/Water Mixtures Stabilize Secondary-Structure Formation in Peptides: A Molecular Dynamics Study”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (19): 12179–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.182199699>.
  - \* Rothem, Lilah, Corina Hartman, Aviva Dahan, Jesse Lachter, Rami Eliakim, y Raanan Shamir. 2007. “Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum”. *Free Radical Biology and Medicine* 43 (5): 730–39. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.003>.
  - \* Ruska, Ernst. 2005. “The Development of the Electron and of Electron Microscopy”. En .
  - \* Sabatino, A. Di, R. Ciccocioppo, S. D’Alò, R. Parroni, D. Millimaggi, M. G. Cifone, y G. R. Corazza. 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): 380–86. <https://doi.org/10.1136/gut.49.3.380>.

- \* Sano, Renata, y John C. Reed. 2013. “ER Stress-Induced Cell Death Mechanisms”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (12): 3460–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>.
- \* Saresella, Marina, Francesca La Rosa, Federica Piancone, Martina Zoppis, Ivana Marventano, Elena Calabrese, Veronica Rainone, Raffaello Nemni, Roberta Mancuso, y Mario Clerici. 2016. “The NLRP3 and NLRP1 Inflammasomes Are Activated in Alzheimer’s Disease”. *Molecular Neurodegeneration* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0088-1>.
- \* Sayan, Mutlay, y Brooke T. Mossman. 2015. “The NLRP3 Inflammasome in Pathogenic Particle and Fibre-Associated Lung Inflammation and Diseases”. *Particle and Fibre Toxicology* 13 (1). <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0162-4>.
- \* Schumann, Michael, Britta Siegmund, Jörg D. Schulzke, y Michael Fromm. 2017. “Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier”. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3 (2): 150–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.006>.
- \* Shewry, P. R., J. A. Napier, y A. S. Tatham. 1995. “Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis.” *The Plant Cell* 7 (7): 945–56. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.945>.
- \* Shewry, P. R., S. Parmar, B. Buxton, M. D. Gale, C. J. Liu, J. Hejgaard, y M. Kreis. 1988. “Multiple Molecular Forms of  $\beta$ -Amylase in Seeds and Vegetative Tissues of Barley”. *Planta* 176 (1): 127–34. <https://doi.org/10.1007/BF00392488>.
- \* Shewry, Peter R., y Nigel G. Halford. 2002. “Cereal Seed Storage Proteins: Structures, Properties and Role in Grain Utilization”. *Journal of Experimental Botany* 53 (370): 947–58. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>.
- \* Shewry, P.R., y A.S. Tatham. 1997. “Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins”. *Journal of Cereal Science* 25 (3): 207–27. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0100>.
- \* Shi, Fushan, Mohammed Kouadir, y Yang Yang. 2015. “NALP3 Inflammasome Activation in Protein Misfolding Diseases”. *Life Sciences* 135 (agosto): 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.05.011>.
- \* Singh, Prashant, Ananya Arora, Tor A. Strand, Daniel A. Leffler, Carlo Catassi, Peter H. Green, Ciaran P. Kelly, Vineet Ahuja, y Govind K. Makharia. 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>.
- \* Smith, Nicholas W., Annabel Alonso, Christopher M. Brown, y Sergei V. Dzyuba. 2010. “Triazole-Containing BODIPY Dyes as Novel Fluorescent Probes for Soluble Oligomers of Amyloid A $\beta$ 1–42 Peptide”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391 (3): 1455–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.091>.
- \* Sollid, Ludvig M., y Bana Jabri. 2013. “Triggers and Drivers of Autoimmunity: Lessons from Coeliac Disease”. *Nature Reviews Immunology* 13 (4): 294–302. <https://doi.org/10.1038/nri3407>.
- \* Song, Limin, Lei Pei, Shanglong Yao, Yan Wu, y You Shang. 2017. “NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (marzo). <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00063>.
- \* Stene, Lars C., Margo C. Honeyman, Edward J. Hoffenberg, Joel E. Haas, Ronald J. Sokol, Lisa Emery, Iman Taki, et al. 2006. “Rotavirus Infection Frequency and Risk of Celiac Disease Autoimmunity in Early Childhood: A Longitudinal Study”. *The American Journal of Gastroenterology* 101 (10): 2333–40. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00741.x>.
- \* Tai, Jennifer H., John V. Williams, Kathryn M. Edwards, Peter F. Wright, James E. Crowe, y Terence S. Dermody. 2005. “Prevalence of Reovirus-Specific Antibodies in Young Children in Nashville, Tennessee”. *The Journal of Infectious Diseases* 191 (8): 1221–24. <https://doi.org/10.1086/428911>.
- \* Tamburro, Antonio Mario, Antonietta Pepe, Brigida Bochicchio, Daniela Quaglino, y Ivonne Pasquali Ronchetti. 2005. “Supramolecular Amyloid-like Assembly of the Polypeptide Sequence Coded by Exon 30 of Human Tropoelastin”. *Journal of Biological Chemistry* 280 (4): 2682–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411617200>.
- \* Thannickal, Victor J., y Barry L. Fanburg. 2000. “Reactive Oxygen Species in Cell Signaling”. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 (6): L1005–28. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>.
- \* Tlaskalová-Hogenová, Helena, Renata Stepánková, Tomás Hudcovic, Ludmila Tucková, Božena Cukrowska, Rája Lodinová-Zádníková, Hana Kozáková, et al. 2004. “Commensal Bacteria (Normal Microflora), Mucosal Immunity and Chronic Inflammatory and Autoimmune Diseases”. *Immunology Letters* 93 (2–3): 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.02.005>.

- \* Turner, Patricia V, Thea Brabb, Cynthia Pekow, y Mary Ann Vasbinder. 2011. “Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider”. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 50 (5): 600–613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189662/>.
- \* Urade, Reiko, Nobuhiro Sato, y Masaaki Sugiyama. 2018. “Gliadins from Wheat Grain: An Overview, from Primary Structure to Nanostructures of Aggregates”. *Biophysical Reviews* 10 (2): 435–43. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0367-2>.
- \* Vartdal, F., B. H. Johansen, T. Friede, C. J. Thorpe, S. Stevanović, J. E. Eriksen, K. Sletten, E. Thorsby, H. G. Rammensee, y L. M. Sollid. 1996. “The Peptide Binding Motif of the Disease Associated HLA-DQ (Alpha 1\* 0501, Beta 1\* 0201) Molecule”. *European Journal of Immunology* 26 (11): 2764–72. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261132>.
- \* Veraverbeke, Wim S., y Jan A. Delcour. 2002. “Wheat Protein Composition and Properties of Wheat Glutenin in Relation to Breadmaking Functionality”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42 (3): 179–208. <https://doi.org/10.1080/10408690290825510>.
- \* Verdu, Elena F, David Armstrong, y Joseph A Murray. 2009. “Between Celiac Disease and Irritable Bowel Syndrome: The ‘No Man’s Land’ of Gluten Sensitivity”. *The American Journal of Gastroenterology* 104 (6): 1587–94. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.188>.
- \* Verdu, Elena F., Heather J. Galipeau, y Bana Jabri. 2015. “Novel Players in Coeliac Disease Pathogenesis: Role of the Gut Microbiota”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 12 (9): 497–506. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.90>.
- \* Virgin, Herbert W. 2014. “The Virome in Mammalian Physiology and Disease”. *Cell* 157 (1): 142–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.032>.
- \* Wal, Yvonne van de, Yvonne Kooy, Peter van Veelen, Salvador Peña, Luisa Mearin, George Papadopoulos, y Frits Koning. 1998. “Cutting Edge: Selective Deamidation by Tissue Transglutaminase Strongly Enhances Gliadin-Specific T Cell Reactivity”. *The Journal of Immunology* 161 (4): 1585–88. <http://www.jimmunol.org/content/161/4/1585>.
- \* Wang, X., K. E. Olberding, C. White, y C. Li. 2011. “Bcl-2 Proteins Regulate ER Membrane Permeability to Luminal Proteins during ER Stress-Induced Apoptosis”. *Cell Death and Differentiation* 18 (1): 38–47. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.68>.
- \* Wieser, H. 1996. “Relation between Gliadin Structure and Coeliac Toxicity”. *Acta Paediatrica* 85 (s412): 3–9. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb14239.x>.
- \* Zambetti, Lia Paola, Federica Laudisi, Ginevra Licandro, Paola Ricciardi-Castagnoli, y Alessandra Mortellaro. 2012. “The Rhapsody of NLRPs: Master Players of Inflammation...and a Lot More”. *Immunologic Research* 53 (1–3): 78–90. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8272-z>.
- \* Zhang, Xiaohong, Siquan Sun, Inkyu Hwang, David F Tough, y Jonathan Sprent. 1998. “Potent and Selective Stimulation of Memory-Phenotype CD8+ T Cells In Vivo by IL-15”. *Immunity* 8 (5): 591–99. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80564-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80564-6).
- \* Zimmer, K.-P., I. Fischer, T. Mothes, G. Weissen-Plenz, M. Schmitz, H. Wieser, J. Buning, et al. 2010. “Endocytotic Segregation of Gliadin Peptide 31-49 in Enterocytes”. *Gut* 59 (3): 300–310. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.169656>.
- \* Zimmermann, Christian, Silvia Rudloff, Günter Lochnit, Sevgi Arampatzi, Wolfgang Maison, y Klaus-Peter Zimmer. 2014. “Epithelial Transport of Immunogenic and Toxic Gliadin Peptides In Vitro”. Editado por Maria Gasset. *PLoS ONE* 9 (11): e113932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113932>.
- \* Zmora, N, M Levy, M Pevsner-Fishcer, y E Elinav. 2017. “Inflammasomes and Intestinal Inflammation”. *Mucosal Immunology* 10 (4): 865–83. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.19>.