



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE LAS MUCOSAS

TESIS DOCTORAL:
**INMUNOGENÉTICA DE LA ENFERMEDAD
CELIACA: PAPEL DE LA IL-15 Y SU RECEPTOR**

Presentada por Celia Escudero Hernández
para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Eduardo Arranz Sanz
Dr. José Antonio Garrote Adrados

Index

Abbreviation list.....	1
I. Thesis summary.....	7
1. In English.....	9
2. In Spanish.....	15
II. Introduction.....	23
1. Celiac disease.....	25
1.1. Clinical presentation.....	26
1.2. Diagnosis.....	27
1.3. Celiac disease genetics.....	29
2. Adaptive immune response to gluten.....	31
2.1. HLA molecules.....	32
2.2. Tissue transglutaminase and antigen presentation.....	32
2.3. T lymphocyte response to gluten.....	34
2.4. B cell response to gluten.....	35
3. Innate immune response to gluten.....	36
3.1. The intestinal epithelium.....	36
3.1.1. Gluten transport through the epithelium.....	39
3.2. Intraepithelial lymphocytes.....	41
3.3. Mediators of the innate immune response to gluten.....	43
4. The interleukin (IL)-15.....	45
4.1. IL-15 regulation.....	45
4.2. IL-15 receptor and signaling pathways.....	47
4.3. IL-15 in the immune response.....	50
4.4. IL-15 in other immune diseases.....	52
4.5. IL-15 in infection and cancer.....	53
4.6. IL-15 therapies.....	55

III.	Justification.....	57
IV.	Objectives.....	63
V.	Materials and methods.....	67
	1. Patients and samples.....	69
	2. Caco-2 cell line.....	70
	3. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs).....	72
	4. Genotyping and genetic association analysis	75
	5. Cloning.....	76
	6. Bacterial competence and transformation.....	77
	7. Transformants analysis.....	79
	8. Sequencing.....	79
	9. Subcloning.....	80
	10. Transfection.....	82
	11. Immunofluorescence.....	82
	12. RNA and protein extraction and quantification.....	84
	13. Western blot.....	86
	14. Retrotranscription.....	87
	15. Quantitative PCR (qPCR).....	87
	16. Flow cytometry.....	90
	17. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	91
	18. Statistics.....	91
V.	Results.....	93
	1. <i>IL15</i> e <i>IL15RA</i> gene analysis in celiac disease.....	95
	2. IL-15R α alternative splicing determination in the human intestinal epithelium using Caco-2 cells as a model.....	108
	3. Analysis of the IL-15 and IL-15R α pattern expression in the human intestine.....	119
	4. Common CD stimuli effects in an <i>in vitro</i> model of intestinal epithelium, Caco-2 cells.....	128

VI.	Discussion.....	143
	1. <i>IL15</i> e <i>IL15RA</i> gene analysis in celiac disease.....	145
	2. IL-15R α alternative splicing determination in the human intestinal epithelium using Caco-2 cells as a model.....	147
	3. Analysis of the IL-15 and IL-15R α pattern expression in the human intestine.....	149
	4. Common CD stimuli effects in an <i>in vitro</i> model of intestinal epithelium, Caco-2 cells.....	157
VII.	Conclusions.....	171
	1. In English.....	173
	2. In Spanish.....	175
VIII.	Annex.....	179
IX.	References.....	191
X.	Notes.....	213

Índice

Listado de abreviaturas.....	1
I. Resumen de la tesis.....	7
1. En inglés.....	9
2. En castellano.....	15
II. Introducción.....	23
1. La enfermedad celiaca.....	25
1.1. Presentación clínica.....	26
1.2. Diagnóstico.....	27
1.3. Genética de la enfermedad celiaca.....	29
2. Respuesta adaptativa frente al gluten.....	31
2.1. Moléculas HLA.....	32
2.2. La transglutaminasa tisular y la presentación antigénica.....	32
2.3. La respuesta de los linfocitos T frente al gluten.....	34
2.4. La respuesta de las células B frente al gluten.....	35
3. Respuesta innata frente al gluten.....	36
3.1. El epitelio intestinal.....	36
3.1.1. Transporte de gluten a través del epitelio.....	39
3.2. Los linfocitos intraepiteliales.....	41
3.3. Mediadores de la respuesta innata activada por el gluten.....	43
4. La interleucina (IL)-15.....	45
4.1. Regulación de la IL-15.....	45
4.2. El receptor de IL-15 y vías de señalización.....	47
4.3. La IL-15 en la respuesta inmunológica.....	50
4.4. IL-15 en otras enfermedades mediadas por el sistema inmune.....	52

	4.5. IL-15 en infecciones y cáncer.....	53
	4.6. Terapias con IL-15.....	55
III.	Justificación.....	57
IV.	Objetivos.....	63
V.	Materiales y métodos.....	67
	1. Pacientes y muestras.....	69
	2. Línea celular Caco-2.....	70
	3. Polimorfismos en un único nucleótido (SNPs).....	72
	4. Genotipado y análisis de asociación genética.....	75
	5. Clonación.....	76
	6. Competencia y transformación bacterianas.....	77
	7. Análisis de los transformantes.....	79
	8. Secuenciación.....	79
	9. Subclonación.....	80
	10. Transfección.....	82
	11. Inmunofluorescencia.....	82
	12. Extracción y cuantificación de ARN y proteínas.....	84
	13. <i>Western blot</i>	86
	14. Retrotranscripción.....	87
	15. PCR cuantitativa (qPCR).....	87
	16. Citometría de flujo.....	90
	17. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	91
	18. Análisis estadístico.....	91
VI.	Resultados.....	93
	1. Análisis de los genes <i>IL15</i> e <i>IL15RA</i> en la enfermedad celíaca.....	95
	2. Determinación de las variantes de <i>splicing</i> alternativo de IL-15R α en el epitelio intestinal humano usando como modelo las células Caco-2.....	108

3.	Análisis del patrón de expresión de IL-15 e IL-15R α en el intestino humano.....	119
4.	Efectos de estímulos comunes en la EC en un modelo <i>in vitro</i> de epitelio intestinal, células Caco-2.....	128
VII.	Discusión.....	143
1.	Análisis de los genes <i>IL15</i> e <i>IL15RA</i> en la enfermedad celíaca.....	145
2.	Determinación de las variantes de <i>splicing</i> alternativo de IL-15R α en el epitelio intestinal humano usando como modelo las células Caco-2.....	147
3.	Análisis del patrón de expresión de IL-15 e IL-15R α en el intestino humano.....	149
4.	Efectos de estímulos comunes en la EC en un modelo <i>in vitro</i> de epitelio intestinal, células Caco-2.....	157
VIII.	Conclusiones.....	171
1.	En inglés.....	173
2.	En castellano.....	175
IX.	Anexo.....	179
X.	Bibliografía.....	191
XI.	Notas.....	213

Listado de abreviaturas

λ_{EX} : Longitud de onda de excitación.

λ_{EM} : Longitud de onda de emisión.

aa: Aminoácidos.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

APC: Aloficocianina (allophycocyanin).

ARN: Ácido ribonucleico.

ARN_{linc}: Ácido ribonucleico largo intergénico no codificante.

ARN_m: Ácido ribonucleico mensajero.

AZA: 5' aza-2'-desoxicitidina.

CCL: Ligando de quimiocina (motivo C-C) (*chemokine (C-C motif) ligand*).

CD: *Cluster of differentiation*.

CDS: secuencia codificante (*coding sequence*).

CEGEC: Consorcio español para la genética de la enfermedad celiaca.

CEI: Células del epitelio intestinal.

CEU: Población residente en Utah (EE.UU.) en 1980 descendiente del norte y del oeste de Europa.

Cr: Cromosoma.

COPB: Subunidad β de proteínas del coatómero.

COR: Curva característica operativa del receptor.

CPA: Célula presentadora de antígeno.

Ct: Ciclo umbral (*cycle threshold*).

CXCL: Ligando para quimiocinas (motivo C-X-C) (*chemokine (C-X-C motif) ligand*).

CXCR: Receptor de quimiocinas de motivo C-X-C.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DC: Célula dendrítica (*dendritic cell*).

DMEM: *Dulbeccos's modified Eagle Medium.*

DSG: Dieta sin gluten.

DTT: Ditioneitol.

EBI: Gen inducido por el virus de Eppstein-Barr.

EC: Enfermedad celiaca.

ECR: Enfermedad celiaca refractaria.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*).

EGF: Factor de crecimiento epitelial.

EGFP: proteína fluorescente verde mejorada o *enhanced*.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Em: Endomisio.

EMBL-EBI: Laboratorio Europeo de Biología Molecular – Instituto Europeo de Bioinformática (*European Molecular Biology Laboratory – The European Bioinformatics Institute*).

EpCAM: Molécula de adhesión epitelial (*epithelial cell adhesion molecule*).

ERK: Kinasas reguladas por señales extracelulares.

ESPGHAN: Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas.

Ex: Exón.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*).

GADPH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

GM-CSF: Factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos.

GWAS: estudios de asociación de genoma completo.

HapMap: Proyecto Internacional de Haplotipos Humanos.

HEPES: Ácido hidroxietil piperazina etanosulfónico (*hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*).

HLA: Antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen*).

Hsp: proteína de shock térmico (*heat-shock protein*).

IBGM: Instituto de Biología y Genética Molecular.

IFN: Interferón.

IL: Interleucina.

Ig: Inmunoglobulina.

LAMP1: Proteína asociada a la membrana lisosomal 1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*).

LB: Luria Bertani.

LIE: Linfocitos intraepiteliales.

LSP: Péptido señal largo.

LP: *Lamina propria*.

MAF: Frecuencia del alelo menor (*Minor allele frequency*).

MAPK: Kinasa activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*).

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*).

MIC: Secuencia polipeptídica relacionada con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad 1.

Myd88: Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*).

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*).

NF: Factor nuclear.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

NFKB1: Subunidad p105 de NF- κ B.

NK: células asesinas naturales (*natural killer cell*).

NKG2X: Receptor de células NK de grupo 2, miembro X.

NKT: Células T citolíticas naturales (*natural killer T cell*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*).

PBS: Tampón salino fosfato (*phosphate buffered saline*).

PE: Ficoeritrina (*phycoerythrin*).

PE-Cy7: Ficoeritrina-cianina 7 (*phycoerythrin-cyanine 7*).

PI3K: Fosfoinositol-3-kinasa.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.

R: Receptor.

RTE: Resistencia transepitelial eléctrica.

SDS: Dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*).

SFB: Suero fetal bovino.

sIgA: Forma secretada de la inmunoglobulina A (IgA).

sIL-15R α : Forma secretada de la subunidad α del receptor de interleucina 15.

SNP: Polimorfismo en un único nucleótido (*Single-nucleotide polymorphism*).

SSP: Péptido señal corto.

STAT: transductor de señal y activador de transcripción.

TA: Temperatura ambiente.

TCR: Receptor de células T (*T cell receptor*).

TG2: Transglutaminasa tisular.

TGF- β : Factor transformante de crecimiento beta (*transforming growth factor beta*).

Th: Linfocito T cooperador (*T helper*).

TLR: Receptores tipo Toll (*toll-like receptor*).

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha (*tumor necrosis factor alpha*).

Treg: Linfocitos T reguladores.

TSLP: Linfopoyetina del estroma tímico (*thymic stromal lymphopoietin*).

UTR: Región no traducida (*Untranslated region*).

V: Variante.

ZO-1: *Zonula occludens-1*.

I. Summary / Resumen

Thesis summary

Introduction

Celiac disease (CD) is a chronic and systemic inflammatory disease triggered by gluten prolamins. It affects genetically predisposed individuals (HLA-DQ2 or HLA-DQ8). The only available treatment is a gluten-free diet (GFD).

The immune response against gluten in CD patients is mediated by the adaptive as well as by the innate immune responses. The adaptive immune response is based on antigen presentation of gluten peptides by dendritic cells (DCs) to CD4⁺ T lymphocytes, which generates a pro-inflammatory Th1 response. Tissue transglutaminase (TG2) induces deamidation of gliadin peptides, which increases the affinity of these peptides for HLA molecules that are involved in antigen presentation and CD4⁺ T cell activation. On the other hand, the innate immune response to gluten starts in the intestinal epithelial cell (IEC) compartment, as gluten has the ability to alter the genetic expression of these cells and transport of protein peptides. Besides, gluten generates a stressful situation in IECs which is manifested by interleukin (IL)-15 synthesis. This inflammatory environment promotes intraepithelial lymphocyte (IEL) reprogramming, and expression of NK cell receptors, as NKG2D. These receptors recognize stress signals from the epithelium, and, as a consequence, induce the lysis of epithelial cells, which leads to the characteristic CD villous atrophy.

IL-15 is a pleiotropic cytokine that plays an important role in the pathogenesis of CD. Moreover, its signaling pathways are unique as IL-15 is

secreted with its specific receptor, IL-15R α , and can signal to other cells by transpresentation or by paracrine signaling. IL-15 can also signal to the same cell that produces the cytokine in a reverse or in an intracrine way.

Aims

In this thesis, we aimed to study IL-15 at both genetic and expression levels. In the first case, the objective was to determine if *IL15* and *IL15RA* genes were associated to CD as well as to identify which IL-15R α splicing variants are expressed in the intestinal epithelium. In terms of expression, we aimed to analyze the expression pattern of both molecules in the intestine of CD patients. Moreover, by using a model of intestinal epithelium, we aimed to quantify the IL-15 effects, as well as other molecules effect.

Materials and methods

To carry out these objectives, DNA and serum samples from peripheral blood samples from healthy individuals and CD patients were used. Moreover, duodenal biopsies were obtained from control patients, non-CD pathological controls, CD patients (both children and adult patients with active CD and adult CD patients in a gluten-free diet) and refractory CD (RCD) patients. The following techniques were used: genotyping, cell culture, cloning and transfection (including PCR, electrophoresis, enzyme restriction, competent bacteria transformation and sequence analysis), quantitative PCR (qPCR), protein analysis (western blot and ELISA), immunofluorescence and flow cytometry.

Results

To study the genetic association of *IL15* and *IL15RA* with CD, we genotyped 48 polymorphisms (SNPs) in 1544 DNA samples (728 were from CD patients) that belong to the Spanish Consortium for Genetics of CD (CEGEC). Then, a statistically significant association was found for 2 SNPs from the 3' upstream region of *IL15*: rs4956400 and rs11100722.

The relationship of these SNPs was also studied in a small group of patients from whom data on mRNA (qPCR) and protein (western blot) was available. This analysis detected that genotypes of 8 SNPs from *IL15* and 6 SNPs from *IL15RA* genes correlated with their expression levels. Furthermore, there were 4 more SNPs from *IL15RA* found to be differently related to CD patients that were diagnosed in their childhood or in their adulthood. In conclusion, *IL15* and *IL15RA* genes appear to be related to CD.

To study the different alternative IL-15R α splicing variants which are present in the human intestinal epithelium, the distinct sequences which were obtained from the genetic material from Caco-2 cells were cloned by using a pCRTM2.1-TOPO[®] vector and their sequence was analyzed. For this purpose, PCR and agarose gel electrophoresis as well as transformation of chemically competent *Escherichia coli* DH5 α bacteria were used. The analysis determined the existence of 5 sub-variants derived from the already known variants 1, 2 and 3. However, none of them contains the full sequence that links IL-15 (exon 2).

On the other hand, the analysis of transfected Caco-2 cells with the sub-variants – previously subcloned into the pEGFP-N1 plasmid, where the protein was docked to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) sequence – showed that none of the sub-variants was able to follow the secretory pathway of the cell (the analysis was performed by immunofluorescence and western blot). Nevertheless, by using cultured Caco-

2 cells with 5' aza-2'-deoxycytidine (AZA), we found evidence of regulation by DNA methylation.

Finally, a differential expression of these sub-variants was not found in duodenal tissue of control patients and CD patients.

In order to study the IL-15 and IL-15R α expression, biopsies from control and CD patients were analyzed by qPCR and western blot. The analysis revealed increased mRNA levels of IL-15 related molecules, IFN- γ and IL-21, in CD children and RCD patients. An increase of IL-15R α and STAT3 were also detected in adult active CD patients. So, the IL-15 signaling pathway could be more active in CD patients.

By using IL-15 western blot, we detected lower levels of IL-15 in active CD patients; and using IL-15R α western blot we observed an increased expression of IL-15R α in RCD patients compared with treated CD. A lower level of IL-15R α was also observed in adult GFD CD patients compared with control patients. However, in both western blot analyses two bands were identified which detect the IL-15/IL-15R α complex: the 56 KDa band corresponds to the complex that will follow the secretory pathway, while the 40 KDa band corresponds to the complex that will not follow this route. When the ratio between these two bands is calculated (56 KDa / 40 KDa), IL-15R α levels are significantly increased in the group of active adult CD patients.

On the other hand, a diminished number of intestinal epithelial cells was detected by flow cytometry, especially for RCD patients. Although no variation in IL-15 expression levels was observed in the surface of the epithelial cells.

By using ELISA, a decreased IL-15 concentration was found in serum of CD patients, especially in those on a GFD. Strikingly, IL-15 levels were lower in adult individuals than in children.

Finally, we stimulated Caco-2 cells with IL-15, IFN- γ , IL-21 or with p31-49 and p57-89 peptides from α -gliadin. Then, we measured their transepithelial electrical resistance (TEER), which showed that IL-15, IFN- γ and gliadin peptides impaired the normal growth of these cells in culture in a similar way to a gliadin digest. And, in these conditions, the expression of *zonula occludens* (ZO)-1 studied by immunofluorescence revealed that all the stimuli induce changes in the Caco-2 cell tight-junctions. Peptide p57-89 was the stimulus that showed the most similar pattern to the positive control, pepsin-trypsinized gliadin (PT-gliadin).

Variations of genetic expression were also observed by qPCR in Caco-2 cell cultures. The most relevant variations were caused by p31-49 peptide, which increased the mRNA expression of stress molecules (MICA, Hsp70), chemokines (CCL20, CCL28, IL-8), CXCL10-related molecules (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCR3), the epithelial growth-factor receptor (EGFR) and different cytokines (TGF- β 1, TNF- α , EBI3, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-15 and IL-15R α). The remainder stimuli induce a moderate and diverse effect on these molecules and, what is more relevant; the effects are decreased by IL-15 when added to the culture. As many of the observed effects agree with those observed using biopsies from CD patients, Caco-2 cells represent an useful model of intestinal epithelium to assess the effects of different molecules in the duodenal epithelium of CD patients.

General conclusions

IL15 gene seems to be associated to CD, while its receptor, IL-15R α , might collaborate to the establishment of a decreased threshold of IL-15 response in the duodenal mucosa of CD patients.

On the other hand, Caco-2 cells confirm its usefulness as a model to study the effects of different stimuli in the intestinal epithelial cells of CD patients.

Resumen de la tesis

Introducción

La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad inflamatoria sistémica y crónica provocada por las prolaminas del gluten que afecta a individuos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2 o HLA-DQ8). El único tratamiento disponible es una dieta sin gluten (DSG).

Las respuestas inmunológicas que tienen lugar en los pacientes con EC están mediadas tanto por la respuesta adaptativa como por la respuesta innata. La respuesta adaptativa se basa en la presentación antigénica de péptidos derivados del gluten por las células dendríticas (DC) a los linfocitos T CD4+, los cuales generan una respuesta proinflamatoria de tipo Th1. La transglutaminasa tisular (TG2) provoca la desaminación de péptidos de gliadina, lo que aumenta la afinidad de éstos por las moléculas HLA, que intervienen en la presentación de antígeno y la activación de los linfocitos T CD4+. Por otra parte, la respuesta innata frente al gluten se desarrolla en las células epiteliales intestinales (CEI), ya que el gluten es capaz de alterar la expresión génica y el transporte, además de generar situaciones de estrés que se manifiestan por la síntesis de interleucina (IL)-15. Este ambiente inflamatorio promueve que los linfocitos intraepiteliales (LIE) sufran una reprogramación y la expresen receptores de células NK, como NKG2D, que reconocen las señales de estrés del epitelio. En consecuencia, destruyen el epitelio, conduciendo a la atrofia vellositaria característica del intestino de los pacientes con EC.

La IL-15 es una citocina pleiotrópica que juega un papel fundamental en la patogenia de la EC. Además, sus vías de señalización son únicas, ya que es secretada junto con su receptor específico, IL-15R α , pudiendo señalar a otras células por transpresentación y de forma paracrina, o en la misma célula que la produce de formas reversa e intracrina.

Objetivos

En esta tesis nos planteamos estudiar la IL-15 a nivel genético y a nivel de expresión. En el primer caso, el objetivo fue determinar si los genes *IL15* e *IL15RA* se asocian con la EC y qué variantes de splicing de IL-15R α se expresan en el epitelio intestinal. En cuanto a la expresión, quisimos analizar el patrón de expresión de ambas moléculas en el intestino de los pacientes celíacos, además de cuantificar los efectos de IL-15 y otros estímulos en un modelo de epitelio intestinal.

Materiales y métodos

Para llevar a cabo estos objetivos, se utilizaron muestras de ADN y suero de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con EC; así como muestras de biopsias duodenales de pacientes control, de pacientes control patológico no-EC, de pacientes EC (niños y adultos en actividad y adultos en dieta sin gluten) y de pacientes con EC refractaria (ECR). Las técnicas utilizadas fueron el genotipado, el cultivo celular, la clonación y la transfección (incluyendo la PCR, la electroforesis, la restricción enzimática, la transformación de bacterias competentes y el análisis de secuencias), la PCR cuantitativa (qPCR), el análisis de proteínas (*western blot* y ELISA), la inmunofluorescencia y la citometría de flujo.

Resultados

Para estudiar la asociación genética de *IL15* e *IL15RA* con la EC, se realizó el genotipado de 48 polimorfismos (SNPs) en 1544 muestras de ADN (728 pacientes con EC) pertenecientes al Consorcio Español para la Genética de la EC (CEGEC). Con ello, se estableció una asociación estadísticamente significativa de 2 SNPs de la región 3' aguas arriba de *IL15*: rs4956400 y rs11100722.

También se estudió la relación de los SNPs en un pequeño grupo de pacientes para los que había disponibles datos de expresión de ARNm (qPCR) y de proteína (*western blot*). El análisis detectó que 8 SNPs de *IL15* y 6 SNPs de *IL15RA* correlacionaban cualitativamente con la expresión de su respectivo gen. Además, se observó que otros 4 SNPs de *IL15RA* se relacionan de forma diferente en pacientes EC diagnosticados durante su infancia o durante la edad adulta. Por lo tanto, los genes *IL15* e *IL15RA* parecen estar relacionados con la EC.

Con el fin de determinar las variantes de *splicing* alternativo de IL-15R α existentes en el epitelio intestinal humano, se clonaron diferentes secuencias obtenidas de material genético de las células Caco-2 en el vector pCRTM2.1-TOPO[®] y se obtuvo su secuencia. Para ello se realizaron las técnicas de PCR y electroforesis en gel de agarosa, así como la transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5 α químicamente competentes. El análisis determinó la existencia de 5 sub-variantes derivadas de las variantes 1, 2 y 3 ya descritas. Sin embargo, ninguna de ellas contiene la secuencia completa del exón 2, clave para la unión de IL-15.

Por otra parte, el análisis de células Caco-2 transfectadas con las sub-variantes insertadas en plásmidos pEGFP-N1, que expresarían la sub-variante adosada a la secuencia de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), mostró por inmunofluorescencia y *western blot* que ninguna de ellas era capaz de seguir la ruta secretora de la célula. Sin embargo, por qPCR de material de

células cultivadas en presencia de 5' aza-2'-desoxicitidina (AZA), se hallaron evidencias de que la expresión de estas sub-variantes está regulada por metilación del ADN.

Finalmente, no se observaron diferencias de expresión de ninguna sub-variante en muestras de tejido duodenal de pacientes control y pacientes con EC.

Para el estudio de la expresión de IL-15 e IL-15R α se realizaron análisis por qPCR y *western blot* de material procedente de biopsias duodenales de pacientes control y pacientes con EC. Los análisis revelaron un aumento de ARNm de IFN- γ y de IL-21 en niños con EC y adultos con ECR; así como un incremento de IL-15R α y STAT3 en los pacientes adultos con EC en actividad. Por lo que la vía de señalización de IL-15 podría estar más activa en pacientes con EC, lo cual resultaría en una disminución del umbral de respuesta a IL-15.

Con el *western blot* de IL-15 observamos niveles inferiores de IL-15 en los pacientes con EC en actividad, y con el *western blot* de IL-15R α se halla un mayor nivel de IL-15R α en pacientes con ECR respecto a los pacientes adultos con EC en DSG y un menor nivel en estos últimos respecto a los pacientes control. Sin embargo, en ambos *western blot*, aparecen dos bandas en los que se detecta el complejo IL-15/IL-15R α : la banda de 56 KDa detecta el complejo que sigue la vía secretora y la banda de 40 KDa detecta el complejo que no la continúa. Al calcular el ratio de ambas (56 KDa / 40 KDa), muestra unos valores significativamente mayores para IL-15R α en pacientes con EC en actividad.

Por otra parte, la técnica de citometría de flujo permitió detectar una disminución de células epiteliales en el intestino de los pacientes con EC, en especial, en los pacientes con ECR; aunque no se observaron variaciones en la expresión superficial de IL-15 en las células epiteliales.

Con la técnica de ELISA se detectó una menor concentración de IL-15 en suero de pacientes con EC, especialmente en pacientes con EC en DSG. Curiosamente, los niveles de IL-15 son mayores en niños que en adultos.

Por último, la estimulación de células Caco-2 con IL-15, IFN- γ , IL-21 o con los péptidos p31-49 y p57-89 derivados de la α -gliadina, seguida del análisis de la resistencia transepitelial eléctrica (RTE), indicó que las citocinas IL-15 e IFN- γ , así como los péptidos, impiden un correcto crecimiento de estas células en cultivo. Y en estas condiciones, el estudio por inmunofluorescencia de la proteína *zonula occludens* (ZO)-1 en esas condiciones, revela que todas las citocinas y los péptidos alteran las uniones estrechas entre células Caco-2, siendo el péptido p57-89 la molécula que genera un patrón más similar al control positivo con gliadina pepsinizada-tripsinizada (PT-gliadina).

Se observaron también alteraciones de la expresión génica por qPCR, siendo el péptido p31-49 el que más altera la expresión de ARNm de moléculas de estrés (MICA, Hsp70), de moléculas quimioatrayentes (CCL20, CCL28, IL-8), de moléculas relacionadas con CXCL10 (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCR3), del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) y de diferentes citocinas (TGF- β 1, TNF- α , EBI3, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-15 e IL-15R α). El resto de los estímulos tienen efectos más moderados y variados sobre estas moléculas y, además, los efectos se moderan al estimular conjuntamente con IL-15. Ya que muchos de los efectos observados concuerdan con estudios realizados con biopsias de pacientes con EC, las células Caco-2 representan un modelo de epitelio intestinal útil para valorar los efectos de diferentes moléculas sobre el epitelio duodenal de los pacientes con EC.

Conclusiones generales

El gen *IL15* parece asociarse con la EC, mientras que su receptor, IL-15R α , parece colaborar en el establecimiento de un menor umbral de respuesta a esta citocina en la mucosa duodenal de los pacientes con EC.

Por otra parte, las células Caco-2 aportan resultados útiles para valorar los efectos de diferentes estímulos sobre células epiteliales intestinales de los pacientes con EC.

II. Introducción

1. LA ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celiaca (EC, CIE10: K90.0; OMIM: 212750) es una enfermedad inflamatoria sistémica y crónica provocada por el gluten y otras prolaminas relacionadas que afecta a individuos genéticamente predispuestos. Se caracteriza por la presencia de los haplotipos genéticos del antígeno leucocitario humano (HLA)-DQ2 o DQ8, de anticuerpos específicos de la enfermedad (anti-transglutaminasa tisular, anti-TG2, y anti-gluten), de una lesión en la mucosa del intestino delgado (enteropatía) y de una serie de manifestaciones clínicas dependientes de gluten ¹. El único tratamiento disponible es una dieta sin gluten (DSG) estricta que evite la ingesta de trigo, cebada, centeno y algunas variedades de avena.

El gluten se define como la masa elástica que queda tras el lavado de la harina de trigo para eliminar el almidón y otros constituyentes solubles. Sin embargo, en la práctica se refiere a proteínas ricas en prolina y glutamina (prolaminas) solubles en alcohol que determinan la capacidad de absorción de agua, la cohesividad, la viscosidad y la elasticidad ². En el trigo, las proteínas se dividen en gliadinas y gluteninas, que representan el 69% de la masa total del trigo, las prolaminas de la cebada se denominan hordeínas (46-52%); del centeno, secalinas (30-50%); y de la avena, aveninas (16%) (aunque sólo algunas variedades de avena podrían ser tóxicas para los pacientes celíacos) ³. Puesto que el trigo es el cereal con mayor contenido en prolaminas, la gliadina es la proteína más estudiada. Esta se clasifica según su composición, peso molecular y movilidad electroforética en α/β -gliadinas (28-33 % de la proporción de gliadina en función del contenido proteico total del gluten), en γ -gliadinas (23-31 %), y en ω -gliadinas (3-7 %) ^{2,4}.

1.1. Presentación clínica

La primera descripción de la EC de la que se tiene constancia fue en el siglo II d.C. por Areteo de Capadocia ⁵, aunque en la medicina moderna no se publicó hasta el siglo XIX d.C. por Samuel Gee ⁶. Sus síntomas intestinales se basan en diarrea, distensión abdominal y vómitos; lo que provoca una malabsorción de nutrientes y lleva a un malestar general, a un descenso del tono muscular y a un retraso del desarrollo ⁷. Esta forma clásica de presentación es común en niños, mientras que en adultos el diagnóstico es más complejo por la posible ausencia de síntomas intestinales. En estos casos, es habitual la presencia de anemia ferropénica, pero puede haber manifestaciones cutáneas, hematológicas, neurológicas, articulares, hepáticas, endocrinológicas, ginecológicas o psiquiátricas ⁸. Dada la heterogeneidad de síntomas, la EC se ha comparado con un iceberg: la zona emergente incluiría a los pacientes sintomáticos (ya sea en las formas clásica o atípica); mientras que la zona sumergida y más difícil de caracterizar correspondería con los individuos con susceptibilidad genética, pudiendo ser asintomáticos pero con cierta atrofia de las vellosidades intestinales (enfermedad celiaca silente) o asintomáticos y sin atrofia vellositaria (enfermedad celiaca latente y potencial) ⁹.

A pesar de la antigua creencia de que la EC era una enfermedad poco frecuente, con los avances diagnósticos así como metodológicos, los estudios epidemiológicos más recientes indican una prevalencia del 1% ¹⁰; variando entre las diferentes poblaciones por la frecuencia de los haplotipos HLA-DQ2/DQ8 ¹¹. Incluso en áreas en las que la EC se consideraba rara (Sudamérica, el norte de África u Oriente Medio) o ausente (Asia), los *screening* serológicos demuestran una prevalencia equivalente a los países occidentales ¹¹. En España, la prevalencia es de 0,28% en la población adulta y de 1,40% en la pediátrica ¹². Estas diferencias pueden deberse a la variedad de factores ambientales como pueden ser las infecciones gastrointestinales, el

momento de inicio del consumo de gluten o la concentración ingerida ^{13, 14}. La EC se distribuye también de manera diferencial por sexo y edad, siendo más frecuente en mujeres y menos prevalente cuando la población envejece ¹⁵.

1.2. Diagnóstico

Los criterios diagnósticos se basan en la sintomatología clínica, los marcadores genéticos de riesgo, la determinación de anticuerpos séricos específicos y la evaluación histológica de la biopsia intestinal.

Los marcadores genéticos utilizados en la práctica clínica son los alelos DQA1*05 y DQB1*02, que codifican para el heterodímero HLA-DQ2; y los alelos DQA1*03 y DQB1*0302, que codifican para el heterodímero HLA-DQ8 ¹⁶. Juntos representan el 40% de la heredabilidad genética. Aunque se conocen otros marcadores genéticos, su contribución es mucho menor, lo que hace que sólo los *HLA* sean los que se utilicen en la práctica clínica ¹.

Actualmente, los test serológicos más utilizados son los anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular (anti-TG2) y los IgA anti-entiendomiso (anti-Em), que detectan la enzima transglutaminasa tisular (TG2), importante en la inmunopatogenia de la EC ¹⁷. En los últimos años, se han desarrollado otros anticuerpos específicos contra péptidos desaminados de la gliadina que presentan características similares a los anti-Em y a los anti-TG2 y, además, al tratarse de IgG, no presentan un contratiempo en pacientes con deficiencias de IgA. Sin embargo, se ha demostrado la elevación transitoria de estos anticuerpos en individuos genéticamente predispuestos ^{18, 19}.

Por último, el examen endoscópico sigue siendo una herramienta esencial para observar la lesión de la mucosa intestinal así como para la toma de biopsias duodenales. Gracias a esta técnica se puede analizar la morfología de la mucosa siguiendo la clasificación modificada de Marsh (Marsh-Oberhuber) para el diagnóstico de la EC ²⁰:

- Marsh 0: Mucosa normal.
- Marsh 1: Mucosa de aspecto normal con infiltración linfocitaria (más de 25 linfocitos intraepiteliales, LIE, por cada 100 células epiteliales).
- Marsh 2: Infiltración linfocitaria e hiperplasia de las criptas.
- Marsh 3: Infiltración linfocitaria, hiperplasia de las criptas y atrofia vellositaria leve (3a), subtotal (3b) o total (3c).

Hasta 2012, las recomendaciones de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas (ESPGHAN) para diagnosticar la EC era una lesión atrófica de tipo Marsh 3, respuesta a la dieta sin gluten (DSG) y apoyado, aunque no esencial, por una serología positiva ²¹. Desde entonces, el valor diagnóstico de los anticuerpos ha aumentado y también se consideran las lesiones de tipo Marsh 2. Además, en niños y adolescentes que presentan un diagnóstico claro y un nivel de anticuerpos anti-TG2 superior a diez veces el límite establecido, la EC se puede diagnosticar sin la necesidad de tomar biopsias ¹.

En algunos pacientes con EC, los síntomas pueden reaparecer a pesar de seguir una DSG estricta (pacientes con EC refractaria o ECR)+; lo cual puede conllevar al desarrollo de un linfoma gastrointestinal de células T ²². Esta complicación se suele dar mayormente en pacientes mayores de 65 años, con atrofia vellositaria y presencia de linfocitos intraepiteliales aberrantes (pérdida de marcadores de superficie y expresión de CD3 intracitoplasmática), bajos niveles de hemoglobina y de albúmina en suero. Los pacientes con uno o ninguno de estos factores se identifican como ECR de tipo I, y los pacientes con dos o más factores como ECR de tipo II y, por consiguiente, con mayor riesgo de desarrollar un linfoma ²³. En estos casos, se recomienda continuar la DSG y el tratamiento con corticoides y antiinflamatorios derivados del ácido sulfosalicílico ^{22, 24}.

1.3. Genética de la enfermedad celiaca

En 1973 se identificó el componente genético mayoritario de la EC: *HLA*, localizado en la región cromosómica 6p21, o también denominada *CELIAC1*²⁵. Debido a la ausencia de explicación del 60% del aporte genético, se han buscado otras regiones que se asocien con la EC.

Los primeros estudios realizados fueron los estudios de asociación en familias afectadas. Con ellos, se hallaron otras tres regiones candidatas:

- *CELIAC 2* (5q31-33): no cuenta con genes implicados debido a que no se han replicado los resultados. Es una región con varios genes que codifican para citocinas²⁶.
- *CELIAC 3* (2q33): se han asociado *CD28* e *ICOS* con la EC; las proteínas que codifican, al unir sus ligandos, provocan la proliferación de los linfocitos y la activación de sus citocinas. El gen *CTLA4*, que regula la actividad de los linfocitos T, se ha asociado con la EC sólo en algunas cohortes^{27,28}.
- *CELIAC 4* (19p13.1): es una región que abarca más de 140 genes, de los cuales muchos forman parte de la respuesta inmunológica. Entre ellos se han señalado especialmente *MYO9B*, que tiene un dominio similar a las uniones estrechas de los enterocitos, y *CYP4F2* y *CYP4F3* que codifican leucotrienos (mediadores de inflamación)²⁹.

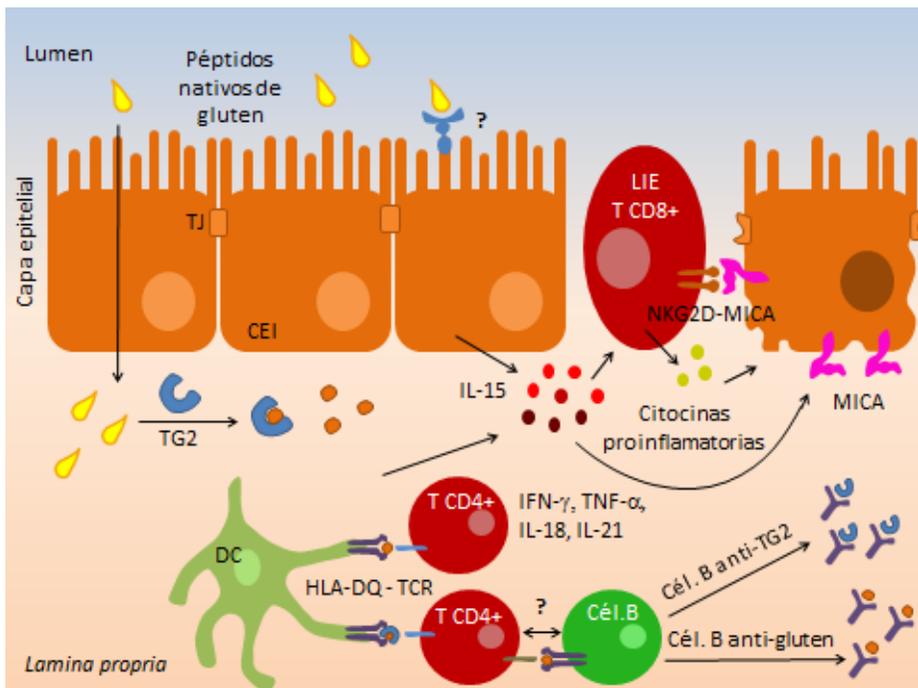
Los estudios de asociación buscan zonas del genoma que se heredan entre familiares; por lo que es útil para encontrar regiones de alta relevancia así como variantes raras que se dan entre familias. Ya que la EC es una enfermedad poligenética, estos resultados han sido difíciles de confirmar entre los diferentes estudios realizados³⁰.

Posteriormente, con la aparición de las nuevas tecnologías de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y del *ImmunoChip*, se han

identificado 14 regiones – que incluyen los genes *IL2* e *IL21* que parecen aportar un 1% del riesgo total ³¹ –, además de otras 13 con relación no significativa pero que podrían tener un papel en la EC ³². Con el *ImmunoChip*, se añadieron otras 13 regiones ³³, obteniendo un total de 40 regiones asociadas con la EC. Estos estudios tienen la ventaja de encontrar variantes comunes con efectos modestos y regiones que posiblemente tengan relevancia en la enfermedad. En éstos se contrastan amplias muestras de pacientes celíacos frente a individuos sanos, en el caso de los GWAS; o de controles y pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes, en el caso del *ImmunoChip*. Aunque las regiones identificadas en estos estudios deben ser analizadas más exhaustivamente, las conclusiones derivadas de los mismos son que las variaciones relacionadas con la EC se encuentran en zonas no codificantes, aunque muchas de ellas cerca de los inicios de transcripción o de las regiones 3'-UTR de los genes ³¹⁻³³.

2. RESPUESTA ADAPTATIVA FRENTE AL GLUTEN

La respuesta adaptativa al gluten ocurre principalmente en la *lamina propria* (LP) mucosa del intestino delgado. Aquí las células dendríticas (DC) presentan los diferentes péptidos derivados del gluten a los linfocitos T CD4+ en el contexto de las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Además, los péptidos pueden ser modificados por la transglutaminasa tisular (TG2), enzima que cataliza su desaminación y que colabora indirectamente en la presentación al hacer a las moléculas HLA más afines por los péptidos. Por último, los linfocitos activados no sólo secretan citocinas proinflamatorias que atraen a otras células del sistema inmunológico al intestino, sino que también proporcionan la ayuda necesaria para la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B. Éstos evolucionan a células plasmáticas y generan ingentes cantidades de anticuerpos anti-gluten y anti-TG2 (fig. 1).



◀ **Figura 1:** Respuestas inmunológicas frente al gluten en la enfermedad celiaca. Los péptidos de gluten inducen estrés en las células epiteliales intestinales (CEI), que sintetizan interleucina (IL)-15, junto con cambios que determinan la reprogramación de los linfocitos intraepiteliales (LIE). Los LIE expresan receptores NKG2D, que reconocen las moléculas de estrés – MICA – expresadas por los enterocitos; colaborando así en la destrucción del epitelio (respuesta innata). Además, al llegar a la *lamina propria*, los péptidos son desaminados por la transglutaminasa tisular (TG2), aumentando la afinidad por las moléculas HLA-DQ expresadas por las células dendríticas (DC) y, con ello, la presentación de antígeno a los linfocitos T y, a continuación, las células B (cél. B) (respuesta adaptativa).

2.1. Moléculas HLA

El principal componente genético en la enfermedad celiaca es la presencia de las variantes genéticas de *HLA* que codifican para las moléculas DQ2 y DQ8; sin embargo, no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad. En los últimos años se ha establecido la idea de “el efecto umbral”; es decir, la dosis de moléculas HLA-péptido necesarias para que se desencadene una respuesta inflamatoria suficiente por las células T CD4+ como para desarrollar la EC ³⁴. Esta idea surge por la mayor susceptibilidad a padecer EC en individuos homocigotos frente a heterocigotos ³⁵. Igualmente, y debido a la diferente composición de las hendiduras peptídicas de cada molécula, los individuos HLA-DQ2 son más susceptibles a padecer la EC que los individuos HLA-DQ8; y dentro de los HLA-DQ2+, HLA-DQ2.5 confiere mayor susceptibilidad que HLA-DQ2.2 ³⁶. A pesar de que en la práctica clínica sólo se tienen en cuenta los heterodímeros DQ2.5 y DQ8, se ha observado que los pacientes que no portan ninguno de éstos portan sólo la variante HLA-DQ2.2+ ³⁷.

2.2. La transglutaminasa tisular y la presentación antigénica

La TG2 tiene un papel fundamental en el mecanismo patogénico al inducir la desaminación de los péptidos inmunodominantes de las gliadinas, haciéndolos más afines para su interacción con las moléculas HLA-DQ2/DQ8

³⁸. Además, la TG2 es el principal auto-antígeno de los anticuerpos séricos que tienen gran valor en el diagnóstico de la EC ³⁹.

Esta enzima de amplia distribución cataliza la formación de uniones covalentes entre grupos carboxilo de glutaminas y grupos amino de lisinas, interviniendo en la apoptosis celular al impedir la salida de material citoplasmático y, cuando es secretada fuera de la célula, colaborando en el ensamblaje de la matriz extracelular durante la reparación de tejidos ⁴⁰. Su ubicación más común es intracelular, pero aparece extracelularmente en respuesta a procesos de lesión tisular. En el intestino normal, la TG2 se expresa en las zonas subepiteliales, en la LP mucosa y en el tejido conectivo alrededor de las criptas. Sin embargo, en el intestino de los pacientes con EC, la TG2 también se expresa en la superficie apical de los enterocitos, efecto que podría ser dependiente de gluten ⁴¹. Es en la superficie apical de los enterocitos donde la TG2 influye en la retrotranscitososis de péptidos de gliadina al interactuar con CD71 y sIgA. Además, los inhibidores de TG2 parecen bloquear el transporte del péptido p31-49 de la α -gliadina por esta vía (ver más adelante) ⁴².

Los efectos de la TG2 sobre los péptidos de gluten tienen lugar en condiciones no fisiológicas (exceso de moléculas donadoras con respecto a lasceptoras) o con un pH menor a 7,0. La gliadina, cuyo contenido en glutamina es superior al 30%, es susceptible a esta desaminación ^{2, 40}, lo cual aumenta la afinidad por las moléculas HLA-DQ (especialmente por HLA-DQ2) al desenmascarar los epítomos más inmunogénicos de la gliadina y otras prolaminas ^{35, 43, 44}. Sin embargo, aunque la desaminación no es un requerimiento absoluto, la reacción potencia la respuesta adaptativa por mejorar la función presentadora de antígeno de las moléculas HLA-DQ y, con ello, la estimulación y activación de los linfocitos T CD4+ reactivos al gluten ⁴⁵. Por otra parte, se ha planteado la hipótesis de que la activación de la TG2 no sea un fenómeno primario, sino que la reacción inflamatoria frente al

gluten nativo podría activar la enzima e inducir su salida del citosol, con lo que se amplificaría la señal proinflamatoria⁴⁶⁻⁴⁸. Por último, la activación de la TG2 y de otras enzimas de la mucosa intestinal también podría ser consecuencia de otros factores ambientales como infecciones víricas⁴⁹, reacciones inflamatorias previas⁵⁰ o un proceso con daño tisular⁵¹.

2.3. La respuesta de los linfocitos T frente al gluten

La respuesta adaptativa mediada por linfocitos T específicos en la LP mucosa requiere la presentación antigénica por las CPAs HLA-DQ2+ o DQ8+. Mientras que en el duodeno normal estas CPAs son macrófagos CD163+ CD11c- (aproximadamente el 80%), y DC tolerogénicas CD103+ CD11c+ (el resto), en el duodeno celiaco la mayor parte de las DC provienen del reclutamiento de monocitos de sangre periférica que maduran posteriormente *in situ* (de fenotipo proinflamatorio, CD14+ CD11c+) y las poblaciones de células tolerogénicas se encuentran disminuidas⁵². Un factor crítico en la diferenciación de las DC proinflamatorias podría ser la elevación en los niveles de IFN- α ⁵³, como sugiere la predisposición a desarrollar EC en pacientes con hepatitis C tratados con IFN- α ⁵⁴ y en individuos con síndrome de Down (el cromosoma 21 contiene el gen que codifica para el receptor de IFN- α)⁵⁵.

Las moléculas HLA-DQ2 y DQ8 pueden presentar también neoepítotos y complejos formados por péptidos de gluten y TG2 a los linfocitos T CD4+ de la LP mucosa^{56, 57}. Estos linfocitos activados desencadenan una respuesta proinflamatoria con secreción de citocinas de perfil Th1, en el que predomina el IFN- γ , además de TNF- α , IL-18 e IL-21, junto a un descenso de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β ⁵⁸⁻⁶⁰. Este conjunto de citocinas y la producción de metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular, pueden contribuir a la lesión celiaca⁴⁴.

2.4. La respuesta de las células B frente al gluten

Como ya se ha indicado, la EC es una enfermedad autoinmune en la que se generan anticuerpos IgA contra la TG2 que desaparecen de la circulación con la retirada del gluten de la dieta ³⁹. Éstos son producidos por las células plasmáticas que infiltran la LP mucosa del duodeno (incrementadas en EC activa) ⁶¹ y que, además, son detectables en el tejido incluso antes de la aparición de síntomas o lesiones en forma de depósitos de IgA ^{62,63}.

Los linfocitos B son CPAs que interactúan con el antígeno vía receptor BCR. En condiciones normales, el intestino contiene pocos linfocitos B vírgenes o de memoria y la mayoría son plasmablastos localizados en la LP con escasa expresión de moléculas HLA-II ⁶⁴. Es probable que los linfocitos B jueguen un papel más importante como CPA en los nódulos linfoides mesentéricos donde podrían amplificar la respuesta de los linfocitos T frente al gluten. Aunque hasta el momento no se han identificado linfocitos T específicos para la TG2, los linfocitos T CD4+ específicos de gluten pueden colaborar en la diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos ⁶⁵. Por otro lado, los anticuerpos anti-TG2 podrían amplificar la respuesta inflamatoria al incrementar la absorción de gluten e inducir la activación de receptores Fc en los granulocitos locales ⁶⁶.

En la EC, se han descrito también otros auto-anticuerpos séricos que presentan distintas especificidades, por ejemplo frente a la actina, a distintos tipos de colágeno, a miembros de la familia de la transglutaminasa (TG3, TG6) y al Factor XIII de la coagulación ⁶⁷. Igualmente, se han encontrado complejos formados por IgA y TG3 en la piel de pacientes con dermatitis herpetiforme ^{68, 69} y anticuerpos anti-TG6 en la ataxia por sensibilidad al gluten ⁷⁰. Estos hallazgos podrían explicar el desarrollo de manifestaciones extraintestinales en la EC.

3. RESPUESTA INNATA FRENTE AL GLUTEN

Se han descrito varios péptidos de gliadina con propiedades estimuladoras de la respuesta innata que actúan sobre las células epiteliales intestinales (CEI) y las DC. Se trata de péptidos no reconocidos por los linfocitos T CD4+ específicos de gluten en el contexto de moléculas HLA-DQ2 o DQ8, como los péptidos p31-43 y p31-49 de la α -gliadina, que podrían alterar el procesamiento y el tráfico intracelular de proteínas mediante la activación de alguna vía de estrés todavía sin identificar ⁷¹⁻⁷³.

3.1. El epitelio intestinal

El epitelio separa la luz del intestino del tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Esta barrera está formada por una sola capa de células columnares polarizadas – CEI o enterocitos – ligadas entre sí por uniones estrechas o *tight-junctions* ⁷⁴. Además, el epitelio puede protegerse y autorregularse, no sólo al controlar el crecimiento de nuevas células y el reemplazo de las antiguas, sino porque algunas CEI se especializan en secretar mucus y péptidos antimicrobianos ⁷⁵ que regularán la cantidad de bacterias comensales y patógenas, a la vez que limitan la resistencia de estos microorganismos a una respuesta antimicrobiana ⁷⁴(fig. 2).

El epitelio intestinal puede intervenir también en la respuesta inmunológica de forma directa debido a la capacidad de las células M y las células caliciformes (*globet cells*) para tomar muestras del contenido luminal y regular las respuestas a través de la expresión de diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los *Toll-like receptors* (TLRs), que reconocen patrones comunes en microorganismos patógenos ⁷⁶; los *NOD-like receptors* (NLRs), que detectan moléculas ajenas o marcadores de daño celular en el citosol ⁷⁷, o los *RIG-I-like receptors* (RLRs), que reconocen ácido ribonucleico (ARN) vírico ⁷⁸ (fig. 2).

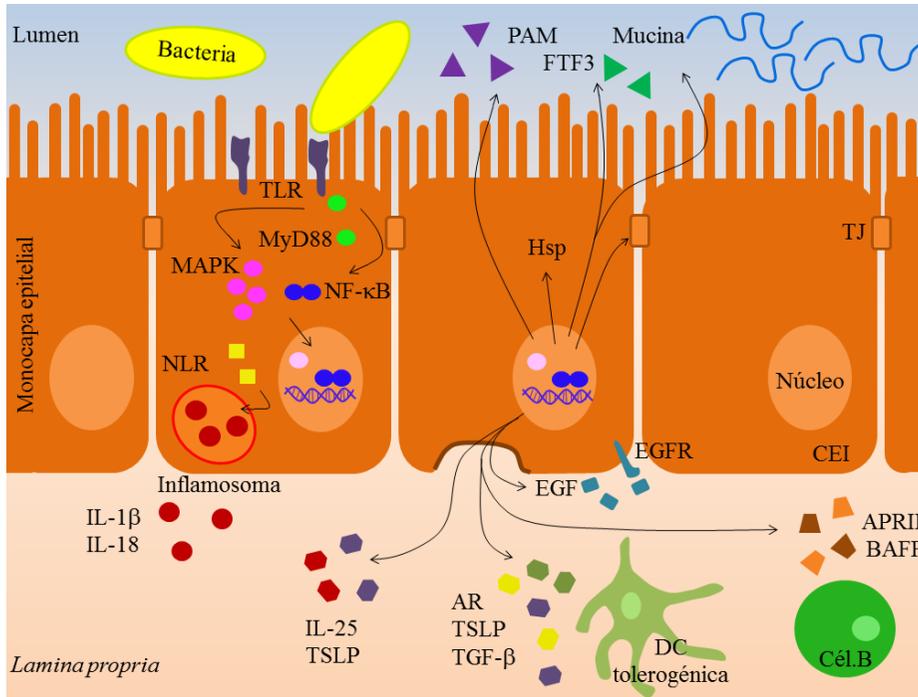


Figura 2: Respuestas inmunológicas del epitelio intestinal. Los patrones asociados a microorganismos son reconocidos por los receptores tipo toll (TLR) o de tipo NOD (NLR) en las células epiteliales (CEI). También pueden reconocer ARN vírico por los receptores tipo RIG-I (no mostrados). Los TLRs, a través de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), activan la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y liberan el factor nuclear NF-κB de sus inhibidores, dando lugar a la expresión de diversos genes. Los NLRs se asocian con la pro-caspasa 1 y forman el inflamosoma, que libera las citocinas proinflamatorias IL-1β e IL-18 (célula de la izquierda). Los factores nucleares favorecen la expresión de mucinas y moléculas protectoras del epitelio: péptidos antimicrobianos, PAMs; factor trefoil 3, FTF3; factor de crecimiento epitelial, EGF; proteínas de *shock* térmico, Hsp. También secretan ácido retinoico (AR), linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) y el factor de crecimiento transformante β (TGF-β), que generan el desarrollo de células dendríticas (DC) de perfil tolerogénico; el ligando inductor de proliferación de células B (APRIL) y el factor de activación de linfocitos B (BAFF), que afectan a los linfocitos B; e IL-25 que, junto con TSLP, ejercen funciones sobre otras células del sistema inmunológico para que la respuesta sea la apropiada (célula de la derecha).

Sin embargo, la necesidad de tolerar los microorganismos comensales y los antígenos inocuos de la dieta ha hecho que las respuestas dependan más de la presencia de señales de peligro derivadas de la infección y el estrés inducidos por microorganismos invasivos. Estos receptores se han

denominado *vita-PAMPs*, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos que intervienen en la viabilidad ⁷⁹. En condiciones normales (ausencia de infección y/o de señales de peligro), el epitelio expresa linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), TGF- β y ácido retinoico, que afectan a la capacidad tolerogénica de las DC, manteniendo así la homeostasis; y mucinas, factor trefoil 3 y péptidos antimicrobianos para protegerse ⁷⁴ (fig. 2). Por otra parte, también son capaces de estimular las diferentes células del sistema inmunológico en respuesta a las señales que reciben los PRR:

- TSLP e IL-25 promueven la diferenciación de progenitores hematopoyéticos en células mononucleares y mieloides para generar una respuesta Th2 frente a helmintos;
- La secreción de IL-25 inhibe la producción de IL-23 por los macrófagos y de IL-22 por las células linfoides innatas de tipo 3 (CLI3) en respuesta a bacterias comensales, mientras que la de IL-7 controla la activación de las células linfoides;
- La expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) estimula la proliferación y supervivencia de los linfocitos intraepiteliales (LIE) CD8 $\alpha\alpha$ + por contacto;
- El ligando inductor de proliferación de células B (APRIL) ⁸⁰ y el factor de activación de linfocitos B (BAFF) promueven la recombinación de cambio de clase en los linfocitos B a células plasmáticas productoras de la forma secretada de IgA (sIgA) ⁸¹.

Por último, los CEI también son capaces de fagocitar a sus invasores vía el adaptador de respuestas primarias de diferenciación mieloide MyD88, protegiéndose a sí mismas y evitando la diseminación de la infección ⁸².

3.1.1. Transporte de gluten a través del epitelio

En condiciones normales, las proteínas son hidrolizadas por las peptidasas gástricas y pancreáticas en el tracto gastrointestinal dando lugar a péptidos o a aminoácidos que, posteriormente, atraviesan el epitelio intestinal por transporte ligado a hidrógeno y transporte activo secundario acoplado a sodio ⁸³. En los pacientes con EC, las proteínas del gluten no se digieren completamente y originan fragmentos resistentes a la proteólisis enzimática ⁸⁴ que, por su tamaño, no se absorben con facilidad y se acumulan en la luz del intestino para terminar atravesando el epitelio por vías alternativas: (1) ruta paracelular, a través de las uniones estrechas entre los enterocitos ⁸⁵; (2) ruta transcelular, por endocitosis y degradación en los lisosomas durante su tránsito hasta la membrana basal de los enterocitos, vía que parece estar alterada en la EC al permitir el paso de péptidos sin procesar hasta la LP mucosa ^{46, 71, 72, 86}; (3) retrotranscitosis, mecanismo que depende de la unión del fragmento de gliadina a la forma secretada de la inmunoglobulina A1 (IgA1s-péptido), que es un ligando del receptor de transferrina, CD71, sobreexpresado en la zona apical de la mucosa de los pacientes con EC en actividad ⁶⁶; o (4) por acceso directo a través de las extensiones que emiten las DC derivadas de monocitos (de fenotipo CD11c^{low} F4/80+ CX3CR1^{high}), que se encuentran intercaladas entre las células del epitelio ^{87, 88}. (Figura 3).

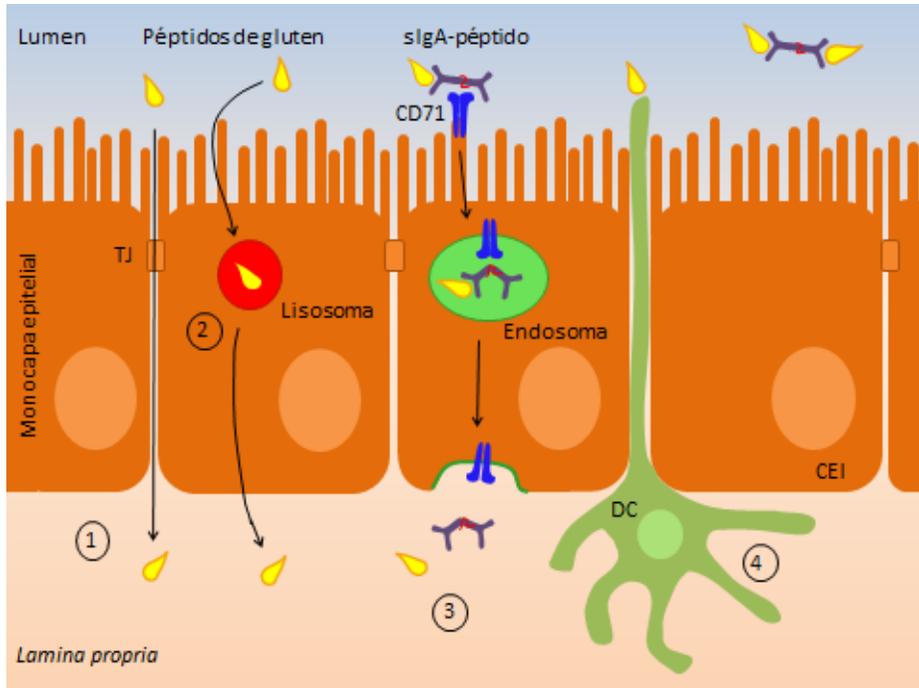


Figura 3: Vías de transporte de péptidos a través del epitelio intestinal: (1) ruta paracelular, a través de las uniones estrechas; (2) ruta transcelular, por endocitosis; (3) retrotranscitosis, por unión a sIgA y CD71; (4) acceso por las dendritas de las células dendríticas. TJ: tight-junctions, sIgA: Inmunoglobulina A secretada, CD71: receptor de transferrina, DC: célula dendrítica, CEI: célula epitelial intestinal.

El paso de los péptidos de gluten a través del epitelio no sólo afecta a la función de barrera intestinal, sino también al perfil de expresión génica o de cascadas de fosforilación de los procesos metabólicos, de la proliferación o de la adhesión celular, entre otros ^{73, 89}. Utilizando dos modelos de cultivo *in vitro* ^{86, 90} y otro en macacos con sensibilidad al gluten ⁹¹, se ha observado que el IFN- γ secretado por los linfocitos T activados de la LP aumenta la permeabilidad intestinal y el paso del péptido inmunorreactivo 33-mer (p57-89) de la α -gliadina a través del epitelio.

De acuerdo al grado de inflamación intestinal, el transporte paracelular podría influir también en el transporte de péptidos a través del epitelio, puesto que la gliadina es capaz de unirse al receptor de quimiocinas

CXCR3 y éste activar al adaptador MyD88, dando lugar a la liberación de zonulina, proteína que reorganiza el citoesqueleto celular y que altera las uniones estrechas^{85, 92, 93}. En la EC, se ha observado un aumento de la expresión de ARN mensajero (ARNm) de CXCL10 y CXCL11 en biopsias de pacientes en fase activa así como una elevación de los niveles séricos de CXCL10 en los mismos pacientes⁹⁴. En el mismo estudio, además de confirmar que CXCL10 es producido por las células plasmáticas y los enterocitos, y que su expresión aumenta en presencia de IL-15, observan también un aumento de la expresión de CXCR3 en las células que infiltran la mucosa intestinal (linfocitos T del epitelio y de la LP y células plasmáticas)⁹⁴.

Además de alterar el transporte de moléculas en los CEI, los péptidos derivados de las gliadinas producen importantes aumentos en la expresión de moléculas relacionadas con el polipéptido MHC-clase I (MIC) en los CEI⁹⁵. Incluso algunos de ellos pueden comportarse de forma similar al factor de crecimiento epitelial (EGF) al retrasar la endocitosis de su receptor (EGFR) y mantener así su activación⁹⁶. Aunque en el epitelio intestinal de los pacientes con EC, la expresión de EGFR y su vía de señalización están alteradas de forma constitutiva (con independencia de la ingesta de gluten), esto podría explicar el daño tan específico de la gliadina en el epitelio⁷³. De forma similar, otros péptidos podrían activar a las DC mediante la interacción con TLR4⁹⁷, además de estabilizar la expresión de moléculas MHC no-clásicas HLA-E en membrana⁹⁸

3.2. Los linfocitos intraepiteliales

Los linfocitos intraepiteliales (LIE) forman una población heterogénea localizada en la zona basolateral de los enterocitos que se distribuye de forma variable a lo largo del intestino. Los LIE se dividen en dos grupos, LIE naturales (células T que expresan el receptor de células T, TCR $\alpha\beta$ y T TCR $\gamma\delta$) y LIE inducidos (T TCR $\alpha\beta$ CD4+ y T TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$ +), de acuerdo a los mecanismos de activación y a los antígenos que

reconocen ^{44, 99}. Las funciones de los LIE son la defensa frente a agentes infecciosos, la adquisición de memoria y el control de las respuestas frente a factores inocuos, así como el mantenimiento de la integridad del epitelio ⁹⁹. Pero a pesar de su papel tolerogénico y protector, los LIE pueden exacerbar la severidad de patologías como la EC o la enfermedad inflamatoria intestinal ⁹⁹⁻¹⁰¹.

En la EC se ha correlacionado el número de linfocitos T TCR $\alpha\beta$ y la atrofia vellositaria ¹⁰² y se ha observado la transformación de los LIE hacia un fenotipo citotóxico ¹⁰³. También aumenta la proporción de LIE TCR $\gamma\delta$ +, que permanece elevada incluso tiempo después de iniciar la dieta sin gluten, lo que representa uno de los cambios más característicos de la EC ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Los LIE naturales comparten algunas características de activación previa con los linfocitos T CD4+ presentes en sangre y en la LP mucosa y, aunque tienen un umbral de activación más elevado que éstos, podrían llegar a activarse en el intestino de los pacientes con EC en respuesta a moléculas proinflamatorias, además de convertirse en células autorreactivas ^{99, 107, 108}. En estas condiciones, los LIE citotóxicos interactúan a través de las moléculas innatas NKG2D y CD94/NKG2C con sus correspondientes ligandos, MICA y HLA-E, expresados en las CEI ¹⁰⁹. Como resultado se produce la linfocitosis intraepitelial y la citotoxicidad por las células del epitelio, además de otras alteraciones como la atrofia de vellosidades y la hiperplasia de criptas ^{99, 110}.

Otras poblaciones celulares que podrían intervenir en la patogenia de la EC son las células *natural killer* (NK) y los linfocitos NKT ¹¹¹. Las células NK intervienen en las respuestas frente a células infectadas por virus y frente a tumores, independientemente de MHC y de la formación de anticuerpos ¹¹². En la EC, se ha observado una disminución del número de las células NK en los pacientes en actividad respecto a los individuos control o los pacientes en dieta sin gluten ¹⁰⁶. A diferencia de las células NK, los linfocitos NKT son un grupo heterogéneo que poseen el complejo TCR en membrana, además de

CD3 y de receptores para Ig y, en algunos subgrupos, expresan también un receptor semi-invariante de TCR (TCR $\nu\alpha 24\beta 11$, entre otros) ¹¹³. Pueden ser activadas vía TCR, pero de forma independiente a MHC ¹¹³, e inducir la producción de IL-10 por el epitelio ¹¹⁴. Sin embargo, el papel de las células NKT en la EC u otras enfermedades no es bien conocido aún, debido a que estas células pueden producir citocinas de cualquier patrón efector, incluidas las reguladoras.¹¹⁵ .

3.3. Mediadores de la respuesta innata activada por el gluten

Además de afectar a la capa epitelial, el gluten provoca un aumento de la expresión de IL-15, de ciclooxigenasa (COX)-2 y de los marcadores de activación CD25 y CD83 en las células mononucleares de la LP mucosa ¹¹⁰. Siendo la IL-15 el principal de estos mediadores en la respuesta frente al gluten en el intestino.

La función habitual de IL-15 consiste en proteger frente a patógenos mediante la activación y el incremento de la citotoxicidad de las células NK y NKT con receptor invariante (iNKT) a la vez que asegurar la prevenir la apoptosis de estas células, de los linfocitos T CD8+ de memoria, de neutrófilos, mastocitos y DC ¹¹⁶. En el intestino celiaco, la IL-15 se produce en grandes cantidades por los CEI en respuesta al gluten, pero también por las células mononucleares, macrófagos y DC de la LP ¹¹⁷. En este contexto, la IL-15 induce la reprogramación de los LIE ¹¹⁸, además de aumentar la expresión de las moléculas de estrés MICA en los enterocitos ¹¹⁹, la activación de las DC ^{120, 121} y la modulación positiva de la IL-21, citocina de papel también relevante en la patogenia de la EC ^{31, 122}. Se ha observado que los péptidos de las gliadinas aumentan la liberación de IL-15 en la mucosa intestinal de los pacientes con EC, pero también en los individuos no celíacos, aunque sólo la mucosa de los primeros muestra una expresión aumentada del receptor IL-15R α , lo que podría conferir un menor umbral de respuesta de estos pacientes a la IL-15 ¹²³.

El hallazgo de una asociación entre la región génica *IL2/IL21* y la susceptibilidad a la EC, ha aumentado el interés por la IL-21, citocina importante en la generación y mantenimiento de la lesión intestinal en esta enfermedad³¹. Además, se ha observado un aumento de la expresión de IL-21 en biopsias de pacientes con EC en actividad⁶⁰, localizándose su producción en células linfocitarias tanto de la LP mucosa como del epitelio y, en ocasiones, puede co-expresarse junto con IFN- γ . Parte de su producción se atribuye también a los linfocitos NKT¹²⁴ y, como se ha indicado anteriormente, su expresión está inducida por la IL-15¹²². A pesar de ser una citocina producida principalmente por linfocitos Th17, otras citocinas que siguen este patrón no se encuentran incrementadas en EC (excepto en un pequeño grupo de celíacos adultos)^{125, 126}.

Ambas citocinas, IL-15 e IL-21, actúan conjuntamente favoreciendo la resistencia de los linfocitos T CD4+ frente a los linfocitos T reguladores (Treg) en la mucosa intestinal de los pacientes con EC actuando sobre varias vías de señalización: se sabe que IL-15 puede interferir con la señal anti-inflamatoria de TGF- β 1 vía Smad3¹²⁷ y de la fosfoinositol-3-kinasa (PI3K)¹²⁸, aunque los mecanismos por los que actúa IL-21 no han sido aún esclarecidos¹²⁹. Finalmente, la IL-15 podría tener también un papel importante en el desarrollo de la EC refractaria (ECR) y el linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL), al inducir proliferación y resistencia a la apoptosis de los LIE citotóxicos¹¹⁷.

4. LA INTERLEUCINA (IL)-15

La IL-15 se descubrió en 1994 por su capacidad de estimular la proliferación de células T de forma similar a la IL-2^{130, 131}. La IL-15 es una citocina pleiotrópica de la familia de citocinas de tipo I que se relaciona con otras como IL-2, IL-7 e IL-21 y algunos factores de crecimiento al compartir la subunidad γc del receptor (IL-2R γc , CD132); y con IL-2 al utilizar IL-2R β (CD122). Se une también a una subunidad específica de alta afinidad: IL-15R α . Es la unión a este receptor y la expresión de ambos en los distintos tipos celulares lo que hace que el ámbito de actuación sea mayor que el de otras citocinas¹³². Además, se requiere de IL-15R α para que IL-15 sea expresada en la membrana y es la única citocina capaz de ser transpresentada a otras células¹³³.

4.1. Regulación de la IL-15

La IL-15 es codificada por el gen *IL15*, localizado en el cromosoma 4q31, formado por nueve exones¹³⁴. Puede dar lugar a dos ARNm diferentes, que se traducen en dos isoformas de IL-15: IL-15 LSP, que tiene un péptido señal largo de 48 aminoácidos y sigue la vía secretora; e IL-15 SSP, que tiene un péptido señal corto de 21 aminoácidos y se queda en el citoplasma y el núcleo¹³⁵. Ambas isoformas dan lugar a la misma IL-15 madura (fig. 4A). En su promotor se encuentran varios sitios para factores de transcripción como NF- κ B u otros en respuesta a interferón (IRF-E) o IL-6 (NF-IL6)¹³⁶. Además, su secuencia 5'-UTR cuenta con doce sitios de inicio de traducción (AUG), lo cual puede limitar su producción entre diez y quince veces¹³⁷. Su péptido señal y la secuencia del extremo carboxilo terminal limitan también su traducción y secreción en comparación con las señales de IL-2. Estos puntos de control hacen que haya una producción hasta 250 veces más limitada de IL-15 en la célula. Por ello, se ha sugerido que el ARNm de IL-15 pueda almacenarse en dominios inactivos de ARN para que, en momentos de

necesidad, sea traducido rápidamente ¹³⁷. Además, aunque su ARNm es expresado constitutivamente en gran cantidad de tejidos y células, la detección de su proteína se restringe a monocitos, células dendríticas, epiteliales y fibroblastos ¹³². La proteína madura de IL-15 cuenta con dos puentes disulfuro (⁴²Cys–⁸⁸Cys y ³⁵Cys–⁸⁵Cys) y cuatro hélices α . En su extremo C-terminal tiene dos sitios para N-glicosilación ¹³².

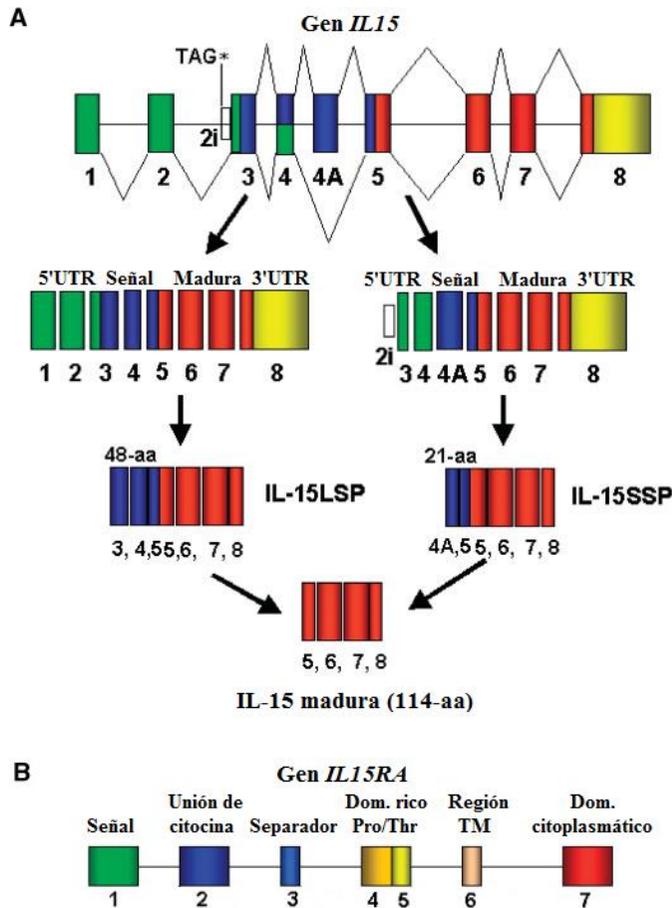


Figura 4: Esquema de los genes *IL15* (A) e *IL15RA* (B). *IL15* se compone de 8 exones y da lugar a dos isoformas que difieren en la longitud del péptido señal; ambas dan lugar a IL-15 madura. El gen *IL15RA* se compone de 7 exones y se han descrito varias isoformas carentes de alguno de los exones o utilizando exones alternativos. 2i, 2° intrón, LSP, péptido señal largo; SSP, péptido señal corto; aa, aminoácidos; Dom., dominio; Pro, prolina; Thr, treonina; TM, transmembranal. Adaptado de Bulfone-Paus S. et al. 2006, *BioEssays* 28:362–377.

4.2. El receptor de IL-15 y vías de señalización

El receptor específico de IL-15, IL-15R α , está codificado por el gen *IL15RA* (cromosoma 10p15.1) que contiene siete exones ¹³⁸. Al igual que IL-15, presenta varias isoformas que carecen de uno o varios exones – como pueden ser $\Delta 2$, $\Delta 3$ o $\Delta 2,3$ ¹³⁸⁻¹⁴⁰ –, cuentan con exones alternativos (Ex2A ¹⁴¹ o Ex7' ¹³⁸) o diferentes sitios de inicio de transcripción ¹³⁸ (fig. 4B).

Cada uno de sus exones configura un dominio diferente en la proteína: el exón 1 codifica para el péptido señal; el exón 2 es el dominio sushi o de unión a IL-15; el exón 3, el conector; los exones 4 y 5 son regiones ricas en prolina y treonina; el exón 6 forma el dominio de membrana y, por último, el exón 7 es el dominio citoplasmático ¹³⁹ (fig. 4B). En total, su zona extracelular cuenta con 173 aminoácidos (de los cuales 32 forman el péptido señal), su dominio transmembranal con 21 aminoácidos y su zona citoplasmática con 37 aminoácidos, la cual contiene sitios para N- y O-glicosilación ¹³⁸. Las isoformas que carecen del dominio sushi (exón 2) no son capaces de unir IL-15 ni de localizarse en el núcleo; sin embargo, parecen competir por el reclutamiento de las otras subunidades transductoras de señal a las que se puede unir IL-15R α en la membrana plasmática: IL-2R β e IL-2R γ c ¹³⁹. Como el ARNm de IL-15, IL-15R α se expresa en gran cantidad de tipos celulares y tejidos, lo que sugiere que este sistema opera en múltiples niveles e incluso podría interconectarlos ¹³².

Como se ha comentado previamente, IL-15R α puede interactuar también con las subunidades IL-2R β , compartida con IL-2; y con IL-2R γ c, compartida también con las citocinas de la misma familia. Incluso estas dos subunidades pueden unir IL-15 sin necesidad de IL-15R α o IL-2R β , y puede unirse también a IL-15R α sin necesidad de IL-2R γ c, dando lugar a receptores de afinidad intermedia ^{142, 143}. Las subunidades IL-2R β e IL-2R γ c forman parte de la familia de receptores de hematopoyetina y son más extensos que

IL-15R α , tanto en su zona extracelular como intracelular pero, ya que ninguna de las tres proteínas tiene actividad enzimática, requieren de Jak kinasas y transductores de señal y activadores de transcripción (STATs): IL-2R β recluta Jak1, dando lugar a su fosforilación y activación de STAT3, mientras que IL-2R γ c recluta Jak3 para activar STAT5¹⁴⁴. También se pueden activar las kinasas de la familia Src, la fosfolipasa C- γ , la PI3K y Akt; dando lugar a la activación de la vía de las kinasas activadas por mitógenos (MAPK), de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y del factor NF- κ B. Además, se ha observado señalización incluso en células que sólo expresan IL-15R α , al asociarse con la kinasa Syk, dando lugar a una disminución de la apoptosis en células B y a un aumento de la fagocitosis en neutrófilos¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. En mastocitos se ha descrito otro receptor, IL-15RX, que señala de forma independiente a otras subunidades vía Jak2/STAT5 y que es capaz de actuar como factor de crecimiento¹⁴⁸.

Una peculiaridad que presenta IL-15 respecto a otras citocinas, es que las células que la expresan, requieren expresar también IL-15R α . Aunque ambas moléculas se traducen y traslocan al retículo endoplasmático de forma independiente, han de interactuar para continuar hacia el aparato de Golgi donde, tras la glicosilación, son secretadas a la membrana plasmática (fig. 5). Una vez en la membrana, IL-15 es transpresentada a otras células por contacto (señalización juxtacrina o transpresentación). Esta interacción simultánea – con la IL-15R α de la célula que presenta IL-15 y con el receptor de la célula que recibe la señal –, es posible ya que IL-15 cuenta con dos sitios de unión (fig. 6)^{133, 149}. En la membrana, el complejo IL-15/IL-15R α puede reciclarse a los endosomas, lo cual podría mantener la señalización de IL-15 al reaparecer de nuevo en la membrana¹⁵⁰; o puede ser liberado como complejo IL-15/IL-15R α soluble mediante proteólisis de IL-15R α ¹³³, consecuentemente, señalarían de forma paracrina a células que expresasen IL-2R β y γ c¹⁴² (fig. 5).

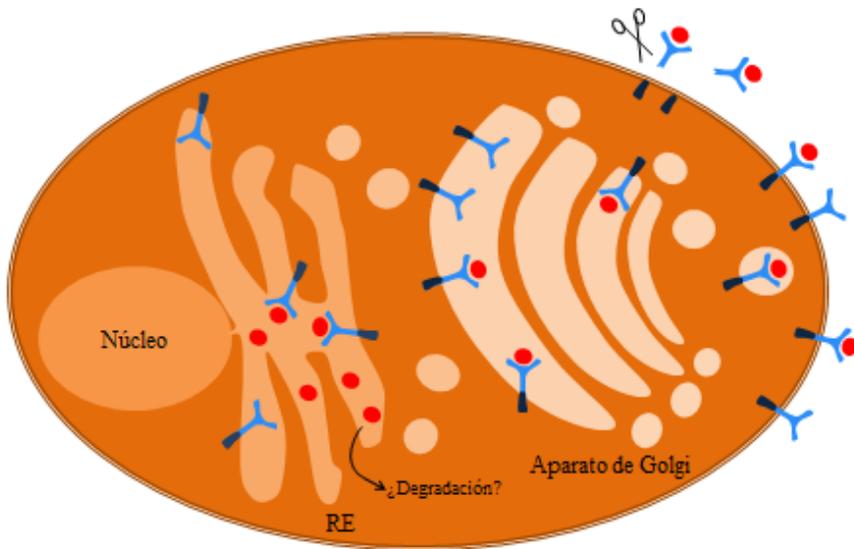


Figura 5: IL-15 e IL-15R α son secretadas conjuntamente. Ambas moléculas interactúan en el retículo endoplasmático (RE) para ser glicosiladas en el aparato de Golgi y secretadas a la membrana plasmática. También pueden ser recicladas a los endosomas y reaparecer en la membrana además de sufrir proteólisis, lo que da lugar a la liberación de IL-15/sIL-15R α . La IL-15 no unida podría ser degradada en el citoplasma. IL-15 en rojo; IL-15R α en azul, cuyo dominio citoplasmático se muestra en azul oscuro.

En algunas células, es posible que la IL-15 aparezca también en membrana de forma independiente a IL-15R α , siendo los monocitos el caso más estudiado ¹⁵¹. En este modelo, IL-15 (LSP), además de poder señalizar por transpresentación, puede transducir señales reversas como si se tratase de un receptor funcional transmembranal de tipo II al interactuar con su receptor en su forma soluble (sIL-15R α) y señalizar vía ERK 1/2, p38 y Rac3 dando lugar a la producción de IL-6 y TNF- α , la secreción de IL-8 y fenómenos de adhesión ¹⁵¹ (fig. 6). La aparición de IL-15 en la membrana podría estar asociada a unión a anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) ¹⁵¹. La señalización reversa, ya sea en presencia o no de IL-15R α , se ha demostrado también en queratinocitos epidérmicos, fibroblastos y células epiteliales ¹⁴⁷. Además, se ha sugerido que IL-15 podría señalizar de forma

juxtacrina y reversa simultáneamente por la posibilidad, antes mencionada, de unirse a dos receptores ¹⁴⁹ o que el complejo IL-15/IL-15R α de la membrana presente la IL-15 en *cis* a IL-2R β/γ c de la misma célula ¹⁵².

Además de estas modalidades de señalización se puede dar señalización intracrina. Ésta es posible gracias a la isoforma IL-15 SSP, sola o interaccionando con IL-15R α , que en el núcleo regula negativamente la expresión de IL-15 ¹⁵³ (fig.6).

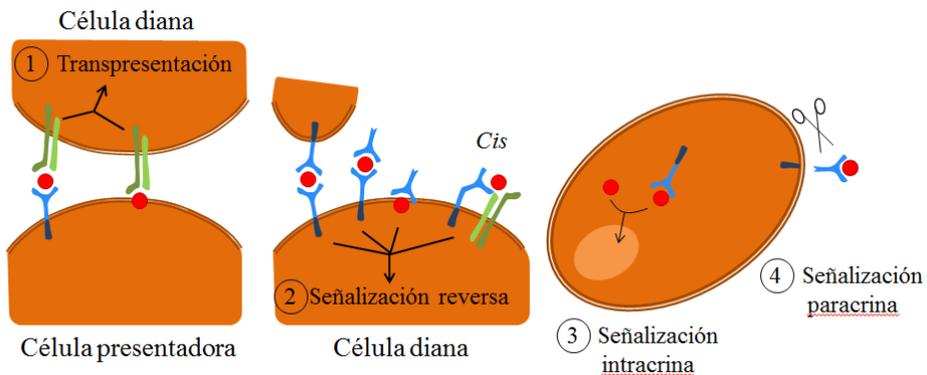


Fig. 6: Posibles vías de señalización utilizadas por IL-15. La vía que parece ser más común es la transpresentación o señalización juxtacrina, en que IL-15 se presenta a otra célula por contacto (1). También podría darse señalización reversa en la misma célula que expresa IL-15 y señalización en *cis* (2) o señalización intracrina en su núcleo (3). A distancia, IL-15 puede señalizar de forma paracrina (4). La IL-15 se muestra en rojo, IL-15R α en azul y el complejo IL-2R β/γ c en verde.

4.3. La IL-15 en la respuesta inmunológica

La IL-15 es una citocina pleiotrópica fundamental en la supervivencia de mastocitos, células NK, neutrófilos y linfocitos T CD8+. En mastocitos, la IL-15 actúa como factor de crecimiento por señalización reversa ¹⁴⁸. En cambio, en las células NK y T CD8+ actúa por transpresentación ¹⁴⁷. En células NK, la IL-15 promueve su desarrollo, supervivencia, diferenciación y citotoxicidad, provocando la producción de citocinas como IFN- γ , TNF- α y el factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) ¹⁵⁴. Algo

similar ocurre en los neutrófilos ¹⁵⁵. En los linfocitos T CD8+, la IL-15 promueve la proliferación y memoria a través de estímulos dependientes de antígenos presentados por macrófagos y células dendríticas. La IL-15 también es capaz de afectar a otros tipos de linfocitos: (1) en linfocitos T CD4+ afecta a su proliferación homeostática, sin embargo expresan mucho menos IL-2R β que los T CD8+ ¹⁵⁶; (2) en linfocitos T naïve CD4+ CD25- periféricos induce su diferenciación a Treg *in vitro* aumentando la expresión de CD25 y *forkhead box* P3 (FoxP3), aunque con características ligeramente diferentes a los Treg obtenidos a partir de sangre ¹⁵⁷; (3) en linfocitos Th17 o Th1/Th17, IL-15 induce proliferación ¹⁵⁸; (4) y en células NKT induce su maduración ¹⁵⁴. Por otra parte, en células dendríticas, IL-15 aumenta la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86, MHC-I/II y de IFN- γ que, consecuentemente, lleva a la activación de células NK y T CD8+ ¹²¹. Aunque en células B activadas *in vitro* IL-15 provoca proliferación, inhibición de apoptosis y producción de Ig, su relación *in vivo* podría ser más compleja ¹⁵⁴.

IL-15 puede colaborar también con GM-CSF en otros tipos celulares: en monocitos promueven su diferenciación a células dendríticas capaces de activar linfocitos T CD4+ o CD8+ ¹⁵⁹ y en los eosinófilos inhiben la apoptosis y activan NF- κ B ¹⁶⁰.

En el intestino, entre las funciones homeostáticas de IL-15 se encuentra la supervivencia de células T TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ + y TCR $\gamma\delta$ para promover la integridad y reparación de la monocapa epitelial ^{116, 161}. En estas células se activan las quinasas Jak1/3, fosfatidilinositol-3-quinasa, Akt y ERK, que dan lugar a la activación de Bcl-2 y Mcl-1 ¹³². También regula el gen de TCR variable $\gamma\delta$ ¹⁶¹. Y, aunque la IL-15 no parece ser fundamental para la supervivencia de células T TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$, aumenta en ellas su capacidad citolítica y la expresión de receptores NK ¹¹⁶. Por último, genera una respuesta a infecciones por los linfocitos intraepiteliales de tipo 1 (IFN- γ) ¹⁵⁴.

4.4. IL-15 en otras enfermedades mediadas por el sistema inmune

Debido a la amplia presencia de IL-15 y su receptor en numerosos tejidos, la desregulación de su expresión da lugar a una respuesta inmunológica inflamatoria. En el caso de la EC, ya se ha indicado que IL-15 aumenta la expresión de moléculas de estrés en los enterocitos y de receptores NK en los linfocitos intraepiteliales, lo cual colabora a desencadenar la destrucción del epitelio intestinal. Todo esto se agrava por la capacidad antiapoptótica que IL-15 confiere a los linfocitos intraepiteliales y la activación a las células dendríticas. Además, se interpone en la acción inhibidora de las células Treg y la respuesta de células T efectoras frente a TGF- β ¹¹⁶.

Sin embargo, la desregulación de IL-15 no es un caso aislado de la EC, también su expresión aumenta en otras enfermedades inflamatorias crónicas. En las dos formas de enfermedad inflamatoria intestinal, tanto colitis ulcerosa como en enfermedad de Crohn, se observa una infiltración de células T, B y macrófagos que producen grandes cantidades de citocinas, entre las que se incluye la IL-15 ¹⁵⁴. La producción de esta citocina parece desencadenar una inflamación crónica del epitelio y aumento de células T CD8+ con características de células NK. También activa células T de la *lamina propria*, que por contacto inducen a los monocitos a producir IL-12 y TNF- α ¹⁶². Además, los pacientes con enfermedad de Crohn que responden a infliximab (anti-TNF- α), presentan unos niveles disminuidos de IL-15 en suero y aumentados para la forma soluble del receptor, sIL-15R α , y el complejo IL-15/sIL-15R α ¹⁶³.

En la artritis reumatoide, caracterizada por la destrucción de uniones cartílago-hueso, los fibroblastos sinoviales y macrófagos producen IL-15 que actúa autocrinamente activando la proliferación, inhibiendo la apoptosis y

atrayendo células T. La IL-15 también actúa sobre neutrófilos y células NK aumentando su citotoxicidad, y sobre células progenitoras de osteoclastos provocando su maduración^{154, 164}. Además, se han identificado variantes genéticas en *IL15* asociadas al progreso de destrucción de uniones¹⁶⁵. Este gen también se ha relacionado con la psoriasis, donde se produce una proliferación descontrolada de la epidermis y una maduración prematura de los queratinocitos¹⁶⁶. En esta enfermedad, IL-15 es sobreexpresada en la dermis y la epidermis y tiene un papel importante en la actividad tanto de las células que infiltran el tejido (células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células T), como las del propio tejido¹⁶⁷. También se ha observado sobreexpresión de IL-15 en diabetes de tipo 1¹⁶⁸ y lupus sistémico eritematoso¹⁶⁹.

Por otra parte, a pesar de que la expresión de IL-15 aumenta también en la esclerosis múltiple (enfermedad del sistema nervioso central mediada por células T CD4+ autorreactivas), se ha demostrado que en la encefalomiелitis de ratón los síntomas empeoran en ratones IL-15^{-/-}¹⁷⁰ o que el tratamiento con IL-15 en ratones *knock out* para este gen parece tener un efecto beneficioso¹⁷¹.

4.5. IL-15 en infecciones y cáncer

Las células NK y T CD8+ son fundamentales para combatir infecciones y eliminar células cancerosas, por lo que IL-15 tiene también un papel en este tipo de enfermedades. En situaciones de infección, la IL-15 conduce a la maduración de macrófagos y células dendríticas, aumentando así su capacidad fagocítica y la producción de IL-8 y de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, que atraerán más monocitos y macrófagos a la zona infectada¹⁷².

En pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) se han hallado niveles disminuidos de IL-15 en suero y en los

individuos que responden al tratamiento antirretroviral expresan IL-15 de forma similar a los individuos sanos ¹⁵⁴. De la misma manera, niveles elevados de IL-15 en la leche materna protegen de una infección post-natal. Sin embargo, también se ha asociado una elevación transitoria de IL-15 con un aumento en la carga viral ^{154, 173}. En hepatitis B y C parece que la producción de IL-15 es deficiente en los momentos de mayor viremia, aunque la rápida elevación de IL-15 no parece ser un requisito para combatir estos virus. Sin embargo, en ambas infecciones se ha observado un descenso tanto en número como en función de células NK ¹⁷³⁻¹⁷⁵. IL-15 también tiene un papel en la infección por virus herpes simplex de tipo 2, ya que los ratones IL-15^{-/-} sin células NK y NKT son más susceptibles ¹⁷⁶.

IL-15 también es importante en infecciones bacterianas como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* o *Salmonella entérica* serovariente Typhimurium, ya que estudios en ratones deficientes de IL-15 muestran más susceptibilidad y pueden mostrar variaciones en la composición de poblaciones de células T CD8⁺ ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

En el cáncer, IL-15 media la eliminación de células cancerosas a través de los efectos que ejerce en células T y NK, además de la colaborar en la diferenciación de monocitos a DC con perfil inflamatorio. Sin embargo, también puede promover la evolución del cáncer en células que expresen IL-15R α o, en cáncer de colon, incrementar la producción de factores angiogénicos por las células epiteliales ^{117, 180}. Por ello, se han realizado numerosos estudios en modelos *in vivo* tanto con ratones *knock out* para *IL15* o *IL15RA* – en los que se halla una ligera inmunodeficiencia por la escasa presencia de células NK y T CD8⁺ – y ratones que sobreexpresan IL-15 – en los que se pueden desarrollar leucemias de células T y NK ¹⁸⁰.

4.6. Terapias con IL-15

Dada la relevancia de IL-15 en un gran número de enfermedades, se han realizado estudios enfocados a inhibir su actividad en enfermedades autoinmunes ¹⁵⁴. En pacientes con ECR de tipo II (propensos a desarrollar linfomas), se han comenzado estudios basados en el anticuerpo Hu-Mik- β -1, dirigido contra IL-2R β para evitar la transpresentación de IL-15; o con ruxolitinib, capaz de inhibir la vía de Jak1/2 ^{116, 181}. Otro candidato es el anticuerpo anti-IL-15 AMG714, que inhibe la activación de Jak3 y STAT5, ya probado en pacientes con artritis reumatoide y psoriasis ¹⁸². Sin embargo, el tratamiento de pacientes con AMG 714 no disminuyó el número de células NK, pudiendo deberse a la redundancia funcional existente entre citocinas ¹⁸². Por otra parte, el inhibidor de Jak2/3, tofacitinib, ha sido probado clínicamente con resultados satisfactorios en colitis ulcerosa ¹⁸³, psoriasis ¹⁸⁴ y artritis reumatoide ¹⁸⁵.

En cambio, en el cáncer así como en infecciones se pretende potenciar el efecto de IL-15 ^{180, 186}. Para ello, se han diseñado desde complejos o proteínas de fusión IL-15/sIL-15R α hasta células tumorales que expresan IL-15, vacunas o terapias génicas dirigidas ^{180, 187}.

III. Justificación

Justificación

La IL-15 tiene un papel fundamental en la enfermedad celiaca ya que no sólo es un potente agente inflamatorio, sino que es el punto de intersección entre las respuestas inmunológicas adaptativa e innata. Además de la relevancia que ha ido tomando en los últimos años, nuestro laboratorio describió un aumento de la expresión de IL-15R α en la mucosa intestinal de los pacientes celiacos y, con ello, una disminución del umbral de respuesta a IL-15¹²³. Por otro lado, se observó también que el gluten inducía la expresión de IL-15 en muestras de tejido intestinal de individuos no celiacos¹⁸⁸.

Para continuar profundizando en el conocimiento de la IL-15 en el marco de la EC, decidimos estudiar esta citocina conjuntamente con IL-15R α debido a la vía de presentación tan particular que tiene el complejo citocina-receptor.

Primero, estudiamos a fondo la relación de ambos genes con la EC en muestras de ADN de individuos sanos y de pacientes celiacos, ya que la información obtenida en los estudios GWAS publicados ha de ser confirmada y podría descartar modificaciones que tengan un papel bajo-moderado en la susceptibilidad a esta enfermedad. Otro objetivo que se planteó fue describir las variantes de *splicing* alternativo derivadas de IL-15R α presentes en el intestino humano, centrándonos en la capa epitelial por ser la primera barrera expuesta a la gliadina y ser capaz de establecer cierta comunicación inmunológica y señalar a través de estas moléculas. Para ello, usamos células Caco-2 como modelo ya que las características morfológicas y funcionales en cultivo son similares a las de los enterocitos. Este modelo, no sólo nos permitió describir las posibles variantes de *splicing*, sino también la

variación de expresión al inhibir la metilación *de novo* u observar los efectos de diferentes estímulos sobre el epitelio.

Finalmente, se estudió la expresión global de IL-15 y su receptor directamente en muestras de biopsia intestinal y de suero tanto de individuos no celíacos como en pacientes con EC.

IV. Objetivos

Objetivos

Este trabajo busca ampliar el conocimiento de la patogenia de la enfermedad celiaca y el papel con el que IL-15 contribuye en la misma.

Con este fin, los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Analizar la posible relación de polimorfismos genéticos de *IL15* e *IL15RA* con la enfermedad celiaca, así como valorar la relación con sus niveles de expresión en tejido duodenal de pacientes celiacos.
2. Determinar las variantes de *splicing* de *IL-15R α* que existen en el epitelio intestinal humano usando como modelo las células Caco-2.
3. Analizar la expresión de *IL-15* e *IL-15R α* en el intestino de los pacientes celiacos.
4. Cuantificar los efectos de la *IL-15* en un modelo de epitelio intestinal en comparación con estímulos inmunológicos y derivados del gluten.

V. Materiales y métodos

1. PACIENTES Y MUESTRAS

Las muestras biológicas utilizadas fueron ADN, biopsias duodenales y suero de origen humano, de los cuales se había obtenido previamente el consentimiento informado del paciente o de los tutores legales si el paciente era menor de edad. La recogida fue anónima, codificándose los datos de los pacientes. El estudio fue aprobado por las Comisiones de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Las muestras de ADN utilizadas en el estudio genético de polimorfismos provienen del Consorcio Español para la Genética de la Enfermedad Celiaca (CEGEC), formado en 2008 por la Sociedad Española de Enfermedad Celiaca (SEEC) para fomentar el intercambio de muestras de ADN entre los diferentes laboratorios que estudian esta enfermedad en España. Su uso está aprobado por todos los centros colaboradores y el ADN se extrajo por métodos convencionales a partir de muestras de sangre periférica. Se utilizó un total de 1544 muestras, de las cuales 816 fueron individuos sanos y 728 de pacientes celiacos.

Las muestras de biopsia duodenal de pacientes adultos proceden del Servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Se recogieron un total de 67 muestras, correspondiendo 9 a pacientes con EC en actividad (al momento del diagnóstico), 11 a pacientes con EC en DSG, 6 a pacientes con EC refractaria, 16 a pacientes control patológicos no EC (presentaron algún tipo de inflamación duodenal como puede ser duodenitis inespecífica o atrofia vellositaria sin presencia de LIE) y 25 a pacientes control sin inflamación duodenal. También se obtuvieron 13 biopsias duodenales de pacientes con EC en edad pediátrica procedentes del

Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Todas las muestras fueron llevadas al laboratorio en suero fisiológico. Las biopsias se utilizaron para estudios de expresión por PCR cuantitativa, *western blot* y citometría de flujo (ver más adelante).

Las muestras de suero fueron obtenidas a partir de sangre periférica; la mitad del Servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (n=21; siendo 7 de pacientes con EC adultos en actividad, 7 de pacientes con EC adultos en DSG y 7 de voluntarios sanos) y la parte restante del Servicio de Pediatría del mismo hospital (n=21; siendo igualmente tres grupos de 7 individuos divididos en EC infantiles en actividad, EC infantiles en DSG e individuos sanos).

La EC se diagnosticó según las indicaciones de la ESPGHAN anteriores a 2012, que incluyen el análisis genético (HLA-DQ), serológico (anticuerpos anti-Em y anti-TG2) y la valoración histológica de la biopsia duodenal.

2. LÍNEA CELULAR CACO-2

La línea celular Caco-2 (p44, *Health Protection Agency*, Londres, Reino Unido) es una línea celular adherente de adenocarcinoma de colon procedente de un hombre caucásico de 72 años. Estas células son similares a los enterocitos por la morfología cilíndrica y el borde en cepillo, la formación de uniones estrechas o *tight-junctions* entre ellas, y la producción de las enzimas propias del intestino. Además, se caracterizan por su capacidad de diferenciarse espontáneamente *in vivo* y formar una monocapa¹⁸⁹.

Los requerimientos para el mantenimiento de las células Caco-2 es el cultivo en medio esencial mínimo modificado (DMEM, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) suplementado con 15% de suero fetal bovino, SFB (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.), 1% de HEPES (Gibco), 1% de aminoácidos no esenciales (Thermo Fisher Scientific) y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a 37 °C y 5% de CO₂. El medio se reemplazó cada dos días y, al alcanzar una confluencia del 80%, se realizó un pase por tratamiento con TrypLE™ *Express* (solución a base de ácido etilendiaminotetraacético, EDTA, y una proteína recombinante similar a la tripsina; incubación durante dos minutos a 37 °C) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Su preservación a largo plazo a -80 °C o en nitrógeno líquido se realizó en el medio de congelación celular Bambanker™ (Lymphotec, Tokyo, Japón). Ya que las propiedades de las líneas celulares pueden variar respecto al número de pases, los experimentos similares fueron realizados con pocos pases de diferencia evitando llegar a un número elevado de los mismos.

Cuando las células Caco-2 fueron estimuladas, éstas se cultivaron en placas de 24 pocillos (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) a una concentración de 50000 células/mL y se cultivaron durante siete días (se cambió el medio de cultivo cada dos días). Una hora antes de ser estimuladas, las células Caco-2 se acondicionaron en medio DMEM completo suplementado sólo con un 2% de SFB durante 1 h tras dos lavados previos con tampón salino fosfato (PBS).

Para estudiar el crecimiento y medir la resistencia transepitelial eléctrica (RTE), la línea se cultivó en insertos de cultivo *o transwell* (Corning) de poliestireno con un poro de 0,4 µm y una superficie de 0,33 cm² a una concentración de 50000 células/mL hasta que formaron una monocapa (10 días) en medio DMEM completo al 15% de SFB. Se utilizó un voltímetro Millicell ERS-2 (Merk Millipore) para medir la RTE, la cual se calculó de la siguiente forma:

$$\text{RTE} = \text{Resistencia (Ohm)} \times \text{Área del inserto (0,33 cm}^2\text{)}$$

Como estímulos exógenos, se utilizaron 50 ng/mL de IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), IFN- γ (SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, EE.UU.) o IL-21 (ImmunoStep, Salamanca, España), 100 μ g/mL de los péptidos p31-49 o p57-89 de la α -gliadina (sintetizados por Biomedal S.L., Sevilla, España) o 1 mg/mL de digeridos con pepsina-tripsina de (PT)-gliadina, zeína o albúmina sérica bovina, BSA (Sigma-Aldrich). La preparación de los digeridos se realizó incubando a 37 °C, primero 500 mg de proteína con 5 mg de pepsina en una solución de HCl 0,2 N (4 horas) y posteriormente con 5 mg de tripsina ajustando el pH a 7,4 (6 horas). Los digeridos se hirvieron durante una hora y, tras centrifugar (2000 g, 10 min), se recogió el sobrenadante para esterilizarlo por filtración y comprobar la presencia de toxinas con el test *E-toxate* siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich).

Se utilizó también 5' aza-2'-desoxicitidina, AZA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 y 10 μ M para inhibir la metilación *de novo* en células Caco-2 cultivadas en placas de 10 mm de diámetro (BD) con una exposición de 24 y 48 horas.

3. POLIMORFISMOS EN UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNPs)

Como genes candidato, se seleccionaron *IL15* (cromosoma, cr 4q31) e *IL15RA* (cr 10p15.1) para el estudio de polimorfismos en un único nucleótido (del inglés, SNPs). Como región candidata para *IL15*, se tuvieron también en cuenta las regiones haplotípicas adyacentes hasta 100 kilobases (Kb), tanto aguas arriba como aguas abajo.

Para seleccionar los SNPs, se obtuvieron los datos de SNPs genotipados del Proyecto Internacional de Haplotipos Humanos, HapMap, que se formó por la colaboración multicéntrica de diferentes países para catalogar la información sobre similitudes y diferencias genéticas entre los seres humanos (localización, propiedades y distribución en diferentes poblaciones) ¹⁹⁰. Recogimos los datos para cr4: 142677204–142974062 (*IL15*) y cr10: 6031259–6060156 (*IL15RA*) de la base de datos más reciente “HapMap Data Rel 28 PhaseII+III, August 10, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126” obtenidos a partir de la población residente en Utah (EE.UU.) en 1980 descendiente del norte y del oeste de Europa (CEU), que es la población disponible más afín a la que se utilizó en la presente tesis (población española).

Los datos se analizaron con Haploview v4.2 ¹⁹¹ considerando una frecuencia del alelo menor (MAF) mayor de 0,1 y un desequilibrio de ligamiento de $r^2 > 0,8$. Entre los dos genes, se obtuvieron 58 SNPs, que se redujeron a 48 por cuestiones técnicas eliminando los SNPs más distantes de la secuencia de *IL15*. Tres SNPs (rs3136619, rs11574674 y rs2296140) fueron sustituidos por otro próximo – ya que no se encontraron SNP relacionados en HaploReg ¹⁹² – con el visualizador de secuencias del Centro Nacional de Biotecnología Americano (del inglés, NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.) al no cumplir los requisitos apropiados para el diseño de cebadores (alto contenido en GC o cebadores con alta probabilidad de interaccionar). Los sustitutos fueron rs3136621, rs8177700 y rs2296141, respectivamente. (Tabla 1).

Identificación del SNP	Cr	%GC	Secuencia
rs4956400	4	42%	...CAGGTGCTCA[C/T]CACCATGACC...
rs13142400	4	27%	...TATATAAAAG[A/G]ATCTGAACAT...
rs4371699	4	36%	...CTTTGGGAAT[A/C]AATTTATCAG...
rs1961720	4	61%	...AACTGACGGC[C/T]GGGCTGCTCT...
rs11930959	4	34%	...TAATTCATGT[A/G]TTCTAGGTTT...
rs11100722	4	47%	...AATTGTAACA[C/G]TCAGCGTGAA...

rs12508866	4	42%	...CTTTACATAA[C/T]GTTGGCCTCA...
rs1519551	4	33%	...TCCCAAGTAC[A/G]TTAACATATG...
rs17461269	4	27%	...ACCATTTAGA[A/T]AAGAATAGTT...
rs957077	4	28%	...TAAAGGACTT[C/T]AAGGAAATTG...
rs17461627	4	33%	...ATCTCACTTG[C/T]AGTCTTTATC...
rs932209	4	48%	...GGGCTTCTAA[C/T]CGATCAGTTA...
rs6850492	4	54%	...CAGTGCTGCC[A/G]TGAGTCAGCA...
rs6842735	4	31%	...CCATGGCATT[G/T]CTCAATCCCA...
rs4956408	4	30%	...ATTGAAGACA[A/G]CAAAAATAAA...
rs9994828	4	29%	...CACTTTTATA[A/G]GGTAGCTCCA...
rs10033884	4	53%	...GGAACAGGCC[C/T]TTAGAGTCCA...
rs996254	4	32%	...TAATATAACT[A/G]ATGAAAGAGT...
rs10519629	4	31%	...AGTCATAATC[A/G]CATAAGTTTT...
rs7677372	4	52%	...GCAGAACCTA[C/T]GCTGCCTGCC...
rs4956410	4	29%	...AAAGACTTGG[A/G]AGATTTAAAT...
rs7663689	4	45%	...TGAGTTTAGT[C/T]TCTTTTCCT...
rs9996010	4	26%	...AATATGCAAC[A/G]TCAAGAGTAA...
rs1389098	4	44%	...CATTATTCTG[C/T]CTAACATGCT...
rs1493023	4	50%	...GACCAAGGTA[G/T]AAGGGCCTGG...
rs1987968	4	35%	...TGTTCCATAA[A/G]CACAGTCTTT...
rs17701271	4	43%	...TGGATATCCA[A/C]CTTCAAGACG...
rs1998521	10	40%	...AAAAGGATT[A/G]CTCTTCACCT...
rs2229135	10	57%	...TATGAAACTC[A/G]GGGAAACCAG...
rs3136630	10	62%	...CCCTGCTCAT[A/G]GTAGAAATGG...
rs3136627	10	60%	...GAGAAAAGAG[C/T]TGCACCTGGC...
rs2296141*	10	50%	...TGCCTGAGAA[A/G]GACAAGGATG...
rs3136626	10	46%	...GTGCAAGTGA[C/T]GATAAGGAGG...
rs3136621*	10	50%	...CTCTTTTGCA[C/T]GGAGCATCCA...
rs3136620	10	56%	...GGCTCAAGGT[C/T]AGCTCTTCAC...
rs2228059	10	56%	...ACAGCCAAGA[A/C]CTGGGAAGCT...
rs8177700*	10	41%	...TCAATTATAG[C/G]TCACTGCAGC...
rs8177694	10	54%	...GGGCGTGAGG[A/C]CTTCTCATGA...
rs8177692	10	55%	...TTGTGAGAC[A/G]CAATGGTGCA...
rs3136615	10	31%	...TTGATATCCA[C/G]GTGTTATATG...
rs3136614	10	57%	...CGAGGACATT[C/T]ATTCCCTCCC...
rs3181148	10	57%	...CCCATCTCAG[A/G]GGTCAAGGGA...
rs2296139	10	56%	...CCAGCCTGAC[A/G]GAGTGCGTGT...
rs8177676	10	48%	...GGAGCAGAAC[A/T]TGAGAAAAA...
rs8177667	10	52%	...TTCAGTAGGC[A/C]AGGCGGGGTG...
rs3736863	10	51%	...TTGGAAAGGC[A/T]TGATTCCCTT...
rs8177655	10	47%	...TGTGCAGGGG[C/T]GTCCATTATG...
rs8177636	10	55%	...CAGAGGAAGG[A/G]GGAAAACAGT...

Tabla 1: Secuencia de los ensayos SNPtype diseñados para los SNPs con los que se genotiparon *IL15* e *IL15RA*. SNP, polimorfismo en un único nucleótido; Cr, cromosoma; IL, interleucina. * SNPs sustitutos de rs3136619, rs11574674 y rs2296140, respectivamente.

4. GENOTIPADO Y ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

El diseño de cebadores y el genotipado se realizó en la Unidad de Secuenciación y Genotipado del Servicio General de Genómica de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Tabla 1). Para el genotipado, se utilizaron la plataforma *BioMark HD*TM, los cebadores específicos *SNPtype*TM y los chips de reacción *Dynamic Array*TM *Integrated Fluidic Circuits* FR48.48 siguiendo las instrucciones del fabricante (todo de Fluidigm, San Francisco, CA, EE.UU.).

Brevemente, el genotipado se realiza por con dos cebadores delanteros o *forward* específicos de alelo marcados con los fluorocromos HEX ($\lambda_{EX} = 535$ nm, $\lambda_{EM} = 556$ nm) o FAM ($\lambda_{EX} = 494$ nm, $\lambda_{EM} = 518$ nm) y un cebador opuesto o *reverse* específico de *locus* común para ambas amplificaciones. Además, se utiliza un cebador *forward* específico aguas arriba de la secuencia de anillamiento de los otros cebadores *forward*; de esta manera, se mejora la reacción posterior con los cebadores *forward* específicos de alelo ya que, durante unos pocos ciclos, se amplifica la secuencia que abarca los SNPs. Por cada chip se hicieron dos reacciones adicionales de controles sin muestra. Los resultados se visualizaron y normalizaron respecto a los valores de fluorescencia de los controles sin muestra con el programa Fluidigm SNP *Genotyping Analysis* v3.1.3 (Fluidigm). Los casos de valoración dudosa se evaluaron manualmente. El análisis de asociación se realizó con gPLINK¹⁹³. El valor de $p < 0,05$ se tomó como estadísticamente significativo.

5. CLONACIÓN

Las diferentes variantes codificantes de ARN mensajero (ARNm) de IL-15R α del epitelio intestinal se obtuvieron mediante PCR convencional con el kit *Go Taq® Green Master Mix* (Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.) y *primers* específicos para cada una de las variantes de IL-15R α que abarcan, como mínimo, toda la región codificante o CDS (Tabla 2). Es decir, que los pesos moleculares de las variantes que se esperaban amplificar corresponden a un peso molecular mayor del que realmente abarca la región CDS, puesto que en PCR realizadas con cebadores diseñados para anclar en las regiones de inicio no amplificaron ninguna secuencia o los productos amplificados se producían con una eficiencia insuficiente para realizar una posterior clonación (pudo haber sucedido debido al alto contenido en CG anterior a la región CDS, datos no mostrados); por tanto, se utilizaron los cebadores identificados en la tabla 2.

El material de partida fue ARN extraído de la línea celular Caco-2 con *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania). Las diferentes variantes se aislaron recortando las bandas de electroforesis en gel de agarosa al 2% (Laboratorios Conda, Madrid, España) y se purificaron con *QIAquick® Gel Extraction kit* (QIAGEN). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Cada ADN obtenido se clonó en el vector pCR™2.1-TOPO® del TOPO® *TA Cloning® kit* (Invitrogen, fig. S1) dejándolo actuar durante toda la noche a 16 °C. Este método aprovecha la capacidad de la enzima Taq polimerasa de actuar como transferasa terminal independiente de molde, con la que añade una desoxiadenosina en los extremos 3' de los productos de PCR. De esta manera el vector, que contiene un residuo de desoxitimidina en sus extremos 3', se complementa con el producto de PCR y, gracias a los residuos 5'-CCCTT que acompañan a esta desoxitimidina terminal, la topoisomerasa I se une al ADN de doble cadena, catalizando la eliminación del enlace fosfodiéster y el

ataque del extremo hidroxilo libre en posición 5', revirtiendo la reacción; es decir, uniendo el producto de PCR al vector y liberando la topoisomerasa I.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	nb
<i>Forward</i> V1 y V2	AGTCCAGCGGTGTCCTGTG	19
<i>Forward</i> V3	ATGTCCGTGGAACACGCAGA	20
<i>Forward</i> V4	AAGCGAAAGCGAATGCGACTGG	22
<i>Reverse</i> común	TCATAGGTGGTGAGAGCAGTTTTC	24

Tabla 2: Secuencia de los cebadores utilizados para las clonar las variantes de IL-15R α (Temperatura de anillamiento: 55 °C). Los cebadores se diseñaron con el programa *Primer Express*® 3.0 (Applied Biosystems) y fueron sintetizados por Mwg Biotech (Ebersberg). V, variante; nb, número de bases.

6. COMPETENCIA Y TRANSFORMACIÓN BACTERIANAS

La bacteria *Escherichia coli* DH5 α TM químicamente competente fue utilizada para generar el ADN plasmídico. La capacidad de incorporar ADN exógeno del ambiente o competencia se adquirió en el laboratorio de manera artificial, haciendo que las bacterias se permeabilizasen pasivamente al ADN circular. Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo Luria Bertani, LB, a 37 °C: 10 mg/mL de triptona (Sigma-Aldrich), 10 mg/mL de cloruro sódico (Panreac, Barcelona, España), 3 mg/mL de extracto de levadura (Laboratorios Conda) y, para medio LB sólido, 115 mg/mL de agar (Sigma-Aldrich).

Para otorgar la competencia a las bacterias, éstas se crecieron durante una noche en 5 mL de medio LB líquido en un incubador con agitación a 37 °C y 200 revoluciones por minuto, rpm. Al día siguiente, se inocularon en una proporción 1:100 en 100 mL de medio LB líquido y se crecieron durante unas horas (37 °C, 200 rpm) monitorizando su densidad óptica a 600 nm en un lector GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) hasta que alcanzó un valor entre 0,3 y 0,5. A continuación, se atemperaron en

hielo durante 15 min y se centrifugaron a 3000 g a 4 °C durante 15 min. Tras decantar el sobrenadante se añadieron 20 mL de cloruro de magnesio 100 mM (Sigma-Aldrich), se resuspendió suavemente y se centrifugó a 2000 g a 4 °C durante 15 min. Se repitió la operación añadiendo 20 mL de cloruro de calcio 100 mM (Sigma-Aldrich) e incubando en hielo durante 45 min. Por último, se centrifugó a 2000 g a 4 °C durante 15 min, se decantó y se añadieron 4 mL de una de cloruro de calcio 100 mM al 20% de glicerol autoclavado (Sigma-Aldrich). Rápidamente se congelaron alícuotas de 100 µL en hielo seco. La competencia se mantiene durante aproximadamente tres meses siendo almacenadas a -80 °C.

La transformación bacteriana se realiza en bacterias competentes para provocar la absorción de ADN, en este caso, de origen plasmídico y circular. El ADN plasmídico se añadió a una alícuota de 100 µL de bacterias químicamente competentes y se incubó en hielo durante 30 min. Se dio un choque térmico a 42 °C durante 90 seg y se volvió a incubar en hielo durante 5 min. Posteriormente, se permitió el crecimiento de las bacterias en medio LB durante 1 h a 37 °C y 200 rpm. Las bacterias se sembraron en una placa de medio LB sólido con el antibiótico de resistencia correspondiente al plásmido que se insertó y se crecieron durante un día a 37 °C en el incubador.

Los antibióticos de resistencia utilizados fueron ampicilina a una concentración de 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) para el vector pCRTM2.1-TOPO® (Life Technologies) y kanamicina a 30 µg/mL (Sigma-Aldrich) para el vector pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, EE.UU.).

7. ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES

Las bacterias transformadas y crecidas en placas de LB-agar con antibiótico mostraron gran cantidad de unidades formadoras de colonias. Para analizar si contenían las secuencias o sólo el plásmido sin el inserto, se aislaron al azar diferentes colonias en 5 mL de medio LB líquido con antibiótico y se dejaron crecer durante un día a 37 °C y 200 rpm. Las colonias se identificaron por PCR y electroforesis en gel de agarosa al 1 % en las mismas condiciones en las que se obtuvo la variante correspondiente (ver el apartado “Clonación”). El ADN de las colonias positivas se extrajo con *QIAprep® Spin Miniprep kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó en el espectrofotómetro *GeneQuant* 1300 (GE Healthcare) o *NanoDrop* ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se hizo una segunda comprobación por digestión a 37 °C con las enzimas BamHI y XhoI (ambas de New England BioLabs, Ipswich, MA, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Anteriormente se había analizado el mapa de restricción de IL-15R α con la herramienta *MapDraw™* de *DNASar* v5.00 (DNASTAR, Madison, WI, EE.UU.) y, además de no hallar puntos de corte internos en la secuencia, sus sitios de restricción se encontraban incluidos en las secuencias de los dos vectores que se utilizaron en el estudio, lo que las hizo ideales tanto para comprobar los insertos como para subclonar las secuencias (ver a continuación).

8. SECUENCIACIÓN

Al obtener las secuencias en el vector pCRTM2.1-TOPO®, se solicitó la secuenciación por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) con el cebador opuesto o *reverse* de M13 (secuencia incluida en el vector y cuyo cebador se proporciona en el kit) y con

el cebador *reverse* de la variante de IL-15R α . Las preparaciones se entregaron según las indicaciones del servicio: 500 ng de plásmido y 4 pmol de cebador en un volumen final de 7,5 μ L. El material que utiliza el servicio se compone de un termociclador Veriti® 96-*well* (Life Technologies), un eliminador de terminadores marcados no incorporados *Agencourt CleanSEQ* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) y un secuenciador automático ABI3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Las secuencias se contrastaron utilizando el paquete *EditSeq*TM de *DNASStar v5.00* (DNASTAR), el programa *BioEdit v7.2.0* (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EE.UU.) y la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* o *BLAST* (NCBI). Para comparar las secuencias obtenidas con las variantes completas ya descritas se utilizó la herramienta de alineamiento *ClustalW2* (EMBL–EBI, Cambridge, Reino Unido).

9. SUBCLONACIÓN

Las secuencias insertadas en el vector pCRTM2.1-TOPO, se subclonaron en el vector pEGFP-N1 para su posterior expresión en la línea celular Caco-2 (Clontech, Fig. S2). Para ello se diseñaron nuevos cebadores a los que se añadió la secuencia de corte de las enzimas de restricción – XhoI (CTCGAG) en el extremo 5' del cebador *forward* y BamHI (GGATCC) en el extremo 3' del cebador *reverse* – y, además, tres bases nitrogenadas que facilitarían la posterior digestión; de esta forma se evitó clonar zonas del primero de los vectores. Para mejorar la posterior expresión, se añadió la secuencia de Kozak consenso a los cebadores *forward* (CACC). En el cebador *reverse* también se eliminó el codón de terminación (TGA) y se añadieron dos bases nitrogenadas para que encajase en el marco de lectura con la secuencia que se incluye a continuación en el plásmido pEGFP-N1 (la proteína

fluorescente verde mejorada, EGFP) y, así, poder obtener una proteína de fusión (Tabla 3).

Cebador	Secuencia 5' → 3'	nb
<i>Forward</i> V 1-2	<u>ATTCTCGAG</u> CACC ATGGCCCCGCGGCGG	17
<i>Forward</i> V3-1	<u>ATTCTCGAG</u> CACC ATGCTACCTCAAGTCAAGGC	20
<i>Forward</i> V3-2	<u>ATTCTCGAG</u> CACC ATGCCTTCAAATCACCTTCC	21
<i>Forward</i> V3-3	<u>ATTCTCGAG</u> CACC ATGTCCGTGGAACACGCAG	19
<i>Reverse</i> común	<u>ATTCCTAGG</u> GC ATCCACCACTCTCGTCAAAG	21

Tabla 3: Secuencia de los cebadores utilizados para las subclonar las variantes de IL15R α . Las secuencias de las enzimas de restricción se resaltan en negrita y las bases de protección para asegurar la digestión, subrayadas (ATT). La secuencia de Kozak consenso se destaca en rojo y las dos bases añadidas para encajar el marco de lectura, en azul. Temperatura de anillamiento: 60 °C. Los cebadores fueron sintetizados por Mwg Biotech. nb, número de bases; V, variante.

Las secuencias insertadas en el vector pCRTM2.1-TOPO se amplificaron con los cebadores de subclonación con *Go Taq*[®] *Green Master Mix* (Promega), se purificaron con *QIAquick*[®] *PCR Purification kit* (QIAGEN) y se digirieron con BamHI y XhoI durante una noche. Los digeridos se obtuvieron por electroforesis y purificación con *QIAquick*[®] *Gel Extraction kit*. Estos productos se ligaron al vector pEGFP-N1 (previamente digerido) con la enzima ligasa de ADN T4, originaria del bacteriófago T4, siguiendo las instrucciones del fabricante (New England BioLabs). Posteriormente, se realizó la transformación de bacterias competentes y su correspondiente identificación como se ha indicado anteriormente.

10. TRANSFECCIÓN

Las células Caco-2 se transfectaron con las subvariantes derivadas de IL-15R α clonadas en pEGFP-N1 por transfección inversa con *Lipofectamine LTX and Plus Reagent* (Life Technologies). Para transfectar 10⁵ células, se incubó 1 μ g de vector con 200 μ L de medio DMEM sin suero ni antibióticos y 1 μ L de *Plus Reagent* durante 15 min a TA; se añadieron 3 μ L de los lípidos catiónicos (*Lipofectamine LTX*) y se incubó durante 25 min a TA. Por último, se añadió la mezcla de transfección a 10⁵ células Caco-2 recién sembradas. La eficiencia de transfección se comprobó por citometría de flujo con el plásmido pEGFP-N1 sin inserto, siendo del 40-44% (fig. S3).

A las 24 h se substituyó el medio de cultivo por DMEM completo y a las 48 h por DMEM completo con 1 mg/mL de geneticina (Sigma-Aldrich) para asegurar la permanencia del plásmido en las células por la secuencia de resistencia a neomicina que éste contiene.

En función de la fluorescencia observada en el microscopio invertido de fluorescencia, las células transfectadas se utilizaron a las 48-72 horas. El vector pEGFP-N1 sin inserto se utilizó como control.

11. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células Caco-2 transfectadas se analizaron por inmunofluorescencia tras haber sido cultivadas sobre cristales de 12 mm de diámetro (Thermo Fisher Scientific) en placas de 4 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Los cristales se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con para-formaldehído al 4% durante media hora a TA. Tras tres lavados de 5 min con PBS, se eliminó la autofluorescencia del para-formaldehído con 0,1 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl) durante 10 min (todo de Sigma-Aldrich). Tras lavar, se bloquearon las uniones inespecíficas y se permeabilizó con SFB

(Thermo Fisher Scientific) al 3% y Tritón X-100 (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) al 0,25%, respectivamente, durante 30 min. A continuación, se incubó a 4 °C durante la noche en presencia del anticuerpo primario específico de orgánulo diluido, según las recomendaciones del fabricante, en la solución de bloqueo/permeabilización. Un día después se lavó y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario (1:1000) y 4', 6-diamino-2-fenilindol, DAPI (1:1000) diluidos en PBS con SFB. Por último, se hicieron tres lavados de 10 min con una solución de PBS y Tritón X-100 al 0,25%, se eliminaron las sales con agua destilada y se hizo el montaje en un portaobjetos con 2 µL de Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, EE.UU.). Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: IgG policlonal de conejo anti-calnexina humana para marcar el retículo endoplasmático (dilución 1:400), IgG1 monoclonal de ratón anti-subunidad β de proteínas del coatómero (COPB) humana para el aparato de Golgi (dilución 1:100), IgG policlonal de conejo anti-proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP) 1 para los lisosomas (dilución 1:300) (todos de Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo; ambos marcados con Alexa Fluor 594 (Life Technologies). Las preparaciones se analizaron con un microscopio confocal Leica sp5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) con el objetivo de 63x.

Las células Caco-2 utilizadas para observar la distribución de la proteína *zonula occludens* (ZO)-1 se cultivaron en cristales de 12 mm de diámetro hasta generar una monocapa y, tras lavar con PBS, se fijaron durante 5 min con metanol a -20 °C y se permeabilizaron durante 30 seg con acetona a -20 °C (Panreac, Castellar del Vallès, España). Después de tres lavados, se bloqueó durante 30 min con PBS con SFB al 5 % a temperatura ambiente, TA, y se incubó toda la noche con el anticuerpo de conejo anti-ZO-1 humana a 4 °C a una concentración de 0,2 µg/mL (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Al día siguiente, se lavó y se incubó durante 2 h con anticuerpo de cabra anti-

Igs de conejo (1:500) y DAPI (1:1000) a TA. Las muestras se prepararon con Vectashield y se observaron en un microscopio Leica sp5 con el objetivo de 40x, tomando imágenes secuenciales a lo largo del eje Z. Las imágenes fueron procesadas con el software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) Lite para aplicar la proyección máxima.

En todos los casos se realizaron al menos dos secuencias de fotografías por cada duplicado.

12. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN Y PROTEÍNAS

Tanto para las muestras procedentes de tejido como de la línea celular Caco-2 utilizadas en los estudios de expresión, el ARN y las proteínas fueron extraídos por el método de Trizol® (Life Technologies).

Las biopsias, previamente conservadas en RNAlater® (Life Technologies) a -80 °C, se rehidrataron en agua libre de ARNasas (Thermo Fisher Scientific), se incluyeron en 1mL de Trizol® y se homogeneizaron con una batidora para microtubos Heidolph Diax 900 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG., Schwabach, Alemania). Las muestras de la línea celular Caco-2 se conservaron congeladas en Trizol® por un breve periodo hasta su homogeneizaron por repipeteo y extracción de ARN.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se agitaron los homogeneizados y se dejaron reposar durante cinco minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µL de solución fenol-cloroformo-isoamil alcohol (Thermo Fisher Scientific) o de cloroformo (Panreac) para biopsias o muestras de la línea Caco-2, respectivamente. Se agitó y se separaron las fases

por centrifugación. Se transfirió la fase transparente superior (ARN) a un tubo nuevo libre de ARNasas.

El ARN se obtuvo añadiendo 500 μ L de 2-propanol (Panreac), que se incubó durante 10 min, y se precipitó. Se eliminaron sales y otras impurezas lavando dos veces con etanol al 75% diluido en agua libre de ARNasas. Por último, la solución de lavado se eliminó por secado y el ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas. Éste se cuantificó en el *NanoDrop* ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Por otra parte, las proteínas se precipitaron con 1,5 mL de 2-propanol por centrifugación. Se purificaron incubando tres veces con una solución de hidrocloreto de guanidina 0,3 M (Sigma-Aldrich) en etanol al 95% durante 20 min y, a continuación, con etanol al 100%. Las proteínas se secaron en la estufa a 37 °C durante una hora y se resuspendieron por calentamiento (50 °C) y agitación durante 1,5 h en dodecilsulfato sódico, SDS, al 1% (BioRad). La cuantificación se realizó con el kit *DC Protein Assay* (BioRad), basado en el método de cuantificación colorimétrica Bradford y siguiendo las instrucciones del fabricante. Simultáneamente a la cuantificación, se utilizó una curva de calibrado a partir de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich) disuelta en SDS al 1% (BioRad). La lectura de las absorbancias se realizó en un lector de placas Tecan Sunrise™ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza).

También se utilizó el *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) para la extracción de ARN de las células Caco-2 utilizadas en los estudios de clonación, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las proteínas de las células Caco-2 transfectadas se obtuvieron directamente al incubar 20 min en hielo con el *buffer* RIPA e inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

13. WESTERN BLOT

Tras haber obtenido y cuantificado las proteínas del tejido, se cargaron 8 µg de proteína total por cada pocillo en un gel de acrilamida al 15% para separarlos por diferencia de potencial en un *Mini-PROTEAN® Tetra Cell*. Como marcador de peso molecular se utilizó *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (todo de BioRad). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas en húmedo (100 V, 1 h) a una membrana de polifluoruro de vinilideno, PVDF (Thermo Fisher Scientific). Para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos se utilizó una solución de SFB (Thermo Fisher Scientific) al 4% en tampón Tris-borato-EDTA (TBE)-Tween20 0,1% y, para los lavados, TBE-Tween20 0,1% (Isogen Life Science, De Meern, Países Bajos – BioRad). Los anticuerpos primarios utilizados fueron específicos para las proteínas IL-15 e IL-15R α humanas (R&D Biosystems) y para EGFP (Thermo Scientific); sus respectivos anticuerpos secundarios anti-ratón, anti-cabra o anti-cerdo estaban covalentemente unidos a la peroxidasa de rábano (HRP) (Dako, Santa Clara, CA, EE.UU.). Como proteína de referencia se detectó la β -actina en las mismas condiciones. (Millipore, Darmstadt, Alemania).

Para el revelado se utilizaron la solución comercial *SuperSignal WB substrate* (Thermo Fisher Scientific) y el equipo VersaDoc™ (BioRad). Las cantidades relativas se calcularon con el programa *Quantity One v4.6.6*. (BioRad) y se cuantificaron por densitometría.

14. RETROTRANSCRIPCIÓN

El ARN obtenido se retrotranscribió a ADN complementario utilizando el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron 0,05 µg/µL de ARN y los cebadores al azar proporcionados por el fabricante siguiendo las instrucciones recomendadas sin el inhibidor de ARNsas.

15. PCR CUANTITATIVA (qPCR)

Las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron en un volumen final de 10 µL utilizando *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix*, si se iban a utilizar cebadores específicos; o *iTaq™ Universal Probes Supermix*, si se iban a utilizar sondas comerciales para la amplificación y cuantificación del ADN complementario (ambos de BioRad). El equipo utilizado fue el LightCycler® 480 (Roche).

Los cebadores específicos se diseñaron con el programa *Primer Blast* (NCBI) o *Primer Express® 3.0* (Applied Biosystems) teniendo en cuenta cada una de las posibles variantes de cada secuencia y fueron sintetizados por MwG Biotech (tablas 4 y 5).

La cuantificación del ADN complementario se realizó por el método de cuantificación relativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁹⁴. Para ello, se obtuvieron las medias de los ciclos de fluorescencia umbral (del inglés, *threshold cycle*: Ct), se normalizó frente al gen de referencia, GADPH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), y se relativizó frente a la condición control.

Gen	Cebador <i>forward</i> (5'→3')	Cebador <i>reverse</i> (5'→3')
GADPH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
TGFB1	GGACACCAACTATTGCTTCAG	TCCAGGCTCCAAATGTAGG
MICA	TTGACAGGGAACGGAAAGGA	CCAGGTTTTGGGAGAGGAAGA
HSP70	GAACCAGGTGGCGCTGAAC	GGCTTGTCTCCGTCGTTGAT
CCL20	AGCAAGCAACTTTGACTGCTGTC	GGATTTGCGCACACAGACAACCT
CCL28	CCCATTGCCTCCAGCTGTTGCA	TCCCCTGATGTGTCTGTTACTGT
IL8	TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG	ACTTCTCCACAACCCTCTGC
CXCL9	CCCCAACACCCACAGAAG	TACTGTGGCTCTTGCCCTCAA
CXCL10	TGAGCCTACAGCAGAGGAA	TACTCCTGAATGCCACTTAGA
CXCR3	TGAGCAGCACCGACACCTT	CAGGTAGCGGTCAAAGCTGAT
EBI3	Sonda comercial UPL (<i>Universal Probe Library</i> de Roche)	
EGFR	TGACTGCTGCCACAACCAGT	AGCCGTGATCTGTCACCACA
IL15	CCAACCTGGGTGAATGTAATAAGTGA	CAGATTCTGTTACATTCCCATTAGAAGA
IL15RA	GCGACACCACTGTGGCTATCT	TGCACCTCTTCTCAGTCGTCTTT
IL18	GCTTGAATCTAAATTATCAGTC	CAAATTGCATCTTATTATCATG
STAT3	GCCAGAGAGCCAGGAGCA	ACACAGATAAACTTGGTCTTCAGGTATG
STAT5A	AAGAGGTAGAAAAGATTGGG	CTGCGAGTCCTACAGC
STAT5B	CATTCGGTCCCTAGCC	CGCGCTACGTCCATTG
IL21	Sonda comercial UPL (<i>Universal Probe Library</i> de Roche)	

Tabla 4: Secuencia de los cebadores utilizados para la técnica de PCR cuantitativa con células Caco-2. Los cebadores se diseñaron con el programa *Primer Blast* o *Primer Express*® 3.0. Las secuencias se indican en sentido 5'→3' y se acompañan de la secuencia de referencia del gen en la base de datos del NCBI (EE.UU.).

Gen	Cebador <i>forward</i> (5'→3')	Cebador <i>reverse</i> (5'→3')
V1	GGCGACGCGGGGCATCAC	GTGGCGCTGGCCTTTGGTGAA
V2	GGCGACGCGGGGCATCAC	TGAAGCTGCGGGCTTAATGCATTTG
V1-2 276 pb	GACGCGGGTGGCTATCT	TAGGTGGTGAGAGCAGTTTTC
V1-2 510 pb	CGGGAGCCCGCAGCTTC	CAGCAGGACAGTGGACGTGG
V3	GCCGCAGAGAGGGCTGGAGAG	GTGGCGCTGGCCTTTGGTGAA
V3 130 pb *	ATGTCCGTGGAACACGCAGA	TCATAGGTGGTGAGAGCAGTTTTC
V3 348 pb *	ATGTCCGTGGAACACGCAGA	TCATAGGTGGTGAGAGCAGTTTTC
V3 498 pb	TGCATTAGAACCACAGAGATAAGCAGT	CAGCAGGACAGTGGACGTGG
V4	CCCAGTGCCACCACCATCGG	GTGGCGCTGGCCTTTGGTGAA

Tabla 5: Secuencia de los cebadores utilizados para la técnica de PCR cuantitativa con células Caco-2 para análisis de sub-variantes de IL-15R α . Los cebadores se diseñaron con el programa *Primer Blast* o *Primer Express*® 3.0. Las secuencias se indican en sentido 5'→3' y se acompañan de la secuencia de referencia del gen en la base de datos del NCBI (EE.UU.). * Cebadores no específicos: amplifican todas las sub-variantes de la variante 3 y se analizaron por densitometría de bandas del gel de agarosa (según el apartado “western blot”). V, variante; pb, pares de bases.

En el caso de la cuantificación de dos de las variantes identificadas (de 130 pb y de 348 pb), fue necesario realizar un análisis semicuantitativo por densitometría ya que sus secuencias aparecen en el resto de variantes identificadas. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Las cantidades relativas de las bandas de 130 y de 348 pb se calcularon con el programa *Quantity One* v4.6.6. (BioRad).

16. CITOMETRÍA DE FLUJO

Las biopsias utilizadas para análisis por citometría de flujo fueron procesadas inmediatamente después de su obtención en el hospital. Se incubaron en medio RPMI1640 (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con un 10% de SFB (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de gentamicina (Sigma-Aldrich), 1% de EDTA (Sigma-Aldrich) y 1% de ditioneitol, DTT (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C en agitación para obtener la capa epitelial junto con los LIEs. Las células se obtuvieron por centrifugación a 1800 rpm durante 10 min tras haber eliminado los trozos restantes de biopsia. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti TCR $\gamma\delta$ -FITC, anti CD8-PE, anti CD3-APC, anti CD45-PE-Cy7, anti molécula de adhesión epitelial (EpCAM)-FITC y anti IL-15-PE (todos de BD). La incubación se realizó a 4 °C durante 30 min. A continuación, se eliminaron los anticuerpos no unidos con una solución de PBS al 1% de SFB y centrifugando a 1400 rpm durante 7 min.

Las células Caco-2 transfectadas con pEGFP-N1 analizadas por citometría de flujo se separaron con TrypLE™ *Express* (Life Technologies) y se lavaron dos veces con solución de PBS al 1% de FSB.

Todas las muestras se analizaron en un citómetro FC500 con el programa el CXP (Beckman Coulter).

17. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Los niveles de CXCL10, IL-17A e IL-15, fueron cuantificados mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas o ELISA, en muestras de sobrenadante de cultivo de células Caco-2 cultivadas en placas de 24 pocillos o en sueros humanos. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Ray Biotech, Norcross, GA, EE.UU.).

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de asociación génica se realizó con la herramienta gPLINK¹⁹³.

Al realizar el análisis de muestras independientes o pareadas, se utilizó siempre una estadística no paramétrica, siguiendo los estadísticos de Mann-Whitney o de Wilcoxon, respectivamente. En los análisis de correlación se utilizó la correlación de Spearman. Para evaluar las herramientas de análisis empleadas con muestras humanas también se halló la curva característica operativa del receptor (curva COR). Se utilizó la versión v15.0 del programa SPSS (IBM, Armonk, NY, EE.UU.) para realizar la estadística y GraphPad PRISM® v.5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.) para las representaciones gráficas.

VI. Resultados

1. ANÁLISIS DE LOS GENES *IL15* E *IL15RA* EN LA ENFERMEDAD CELIACA

Se seleccionaron los genes *IL15* (cromosoma, cr. 4q31) e *IL15RA* (cr. 10p15.1) como genes candidato para estudiar su relación con la EC. Se tuvieron en cuenta también las regiones adyacentes a *IL15* en 100 Kb ya que se ha descrito la posible existencia de asociaciones en las zonas reguladoras de los genes^{195, 196}. Tomando los genotipos disponibles de la base de datos HapMap (población CEU), se obtuvo una lista de 58 SNPs mediante Haploview (MAF < 0,1 y $r^2 > 0,8$), que se redujo a 48 SNPs por cuestiones técnicas, eliminando los polimorfismos más alejados del gen *IL15*. De la lista final, tres SNPs (rs3136619, rs11574674 y rs2296140) fueron sustituidos por un SNP próximo al no poder diseñarse cebadores específicos. (Tabla 1).



Figura 7: Mapa de desequilibrio de ligamiento (LD) para los SNPs seleccionados mediante Haploview del gen *IL15* y las regiones haplotípicas adyacentes a partir de los datos de la población CEU de HapMap. Los números representan el valor de r^2 ; y los colores, el valor de D' . Los SNPs significativos están marcados con una flecha. SNP, polimorfismo en un único nucleótido; IL, interleucina.

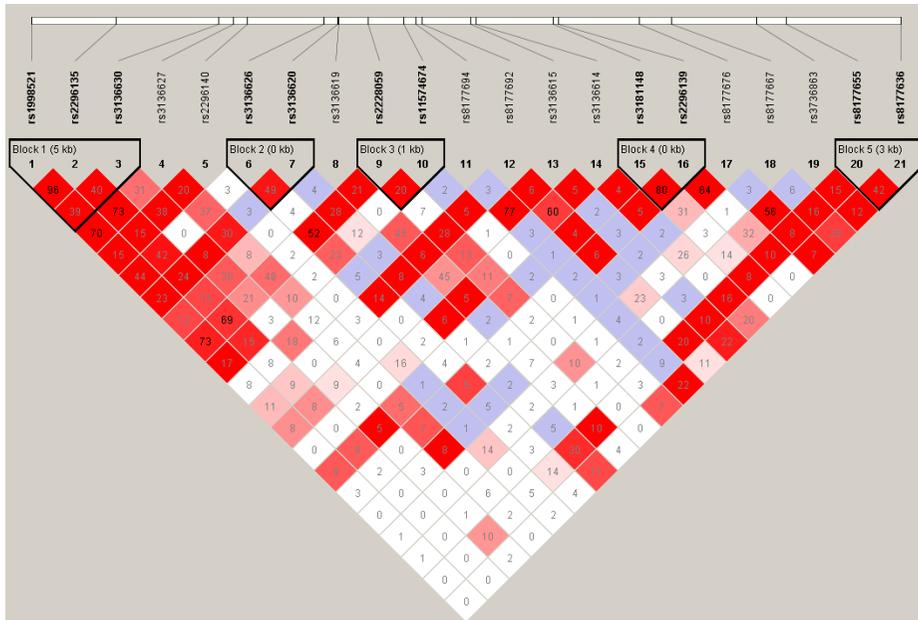


Figura 8: Mapa de desequilibrio de ligamiento (LD) para los SNPs seleccionados con Haploview del gen *IL15RA* a partir de los datos de la población CEU de HapMap. Los números representan el valor de r^2 ; y los colores, el valor de D' . No se pudieron diseñar cebadores para 3 SNPs y los SNP adyacentes sustitutos fueron n° 5, rs2296140; n° 8, rs3136619 y n°10, rs11574674. El genotipado del SNP n° 8 no se pudo asignar. SNP, polimorfismo en un único nucleótido; IL, interleucina.

Los 48 SNPs, 27 correspondientes a la región de *IL15* y 21 a *IL15RA* (figuras 7, 8 y tabla 1), fueron genotipados en 808 muestras del CEGEC, de las cuales 360 eran de pacientes celíacos (tabla 6). El genotipado se realizó mediante la plataforma *BioMark HD™* y sus correspondientes sondas (tabla 1). El SNP n° 11 de *IL15* (rs17461627) fue eliminado del análisis por la baja frecuencia alélica obtenida (fig. 7) y el SNP n°8 de *IL15RA* (rs3136621) no pudo ser genotipado correctamente (fig. 8).

	Primer análisis (48 SNPs)	Segundo análisis (6 SNPs)	Total
Individuos no celíacos	448	368	816
Pacientes celíacos	360	368	728
Total	808	736	1544

Tabla 6: Tamaño de las muestras del CEGEC utilizadas en los análisis de asociación.

El análisis permitió establecer una asociación estadísticamente significativa de cuatro SNPs con la EC ($p < 0,05$), y de otros dos SNPs con valores de p cercanos al valor significativo (Tabla 7). En un segundo análisis de los 6 SNPs realizado en 736 muestras, de los que la mitad eran pacientes celíacos (tabla 6), no se obtuvo significación estadística alguna. Sin embargo, al agrupar todas las muestras, los SNPs rs4956400 y rs11100722 de la región de *IL15* mostraron valores significativos (0,0112 y 0,0087; respectivamente) (tabla 7); ambos localizados en la región 5' aguas arriba del gen *IL15*. El polimorfismo rs4956400 se localiza a 80.405 pb del extremo 5' del gen *IL15* y a 13.741 pb del extremo 3' del gen *RP11-208N20.1* (NCBI: HG497332.1), que codifica para un ARN largo intergénico no codificante (ARNlinc). El polimorfismo rs11100722 se localiza a 20.291 pb del extremo 5' del gen *IL15*.

Cr	Gen	SNP	Coordenada ¹	Alelos ²	Primer análisis				Segundo análisis				Combinado			
					MAF EC	MAF Sanos	valor p ³	OR	MAF EC	MAF Sanos	valor p	OR	MAF EC	MAF Sanos	valor p ³	OR
4	<i>IL15</i>	rs4956400	<u>141556189</u>	C:T	0,404	0,358	0,0627	1,213	0,409	0,365	0,0914	1,201	0,406	0,362	0,0112	1,209
4	<i>IL15</i>	rs11100722	<u>141616307</u>	C:G	0,342	0,291	0,0289	1,266	0,358	0,317	0,1266	1,203	0,349	0,302	0,0087	1,235
4	<i>IL15</i>	rs1493023	<u>141789289</u>	G:T	0,294	0,255	0,0849	1,214	0,263	0,26	0,8843	1,018	0,278	0,257	0,1897	1,113
10	<i>IL15RA</i>	rs3136626	<u>5959053</u>	C:T	0,302	0,256	0,0423	1,254	0,290	0,291	0,9761	0,9965	0,296	0,272	0,1387	1,127
10	<i>IL15RA</i>	rs3136620	<u>5959479</u>	C:T	0,206	0,167	0,0497	1,287	0,196	0,203	0,7642	0,9582	0,201	0,183	0,2169	1,125
10	<i>IL15RA</i>	rs8177655	<u>5973156</u>	C:T	0,321	0,259	0,0064	1,351	0,294	0,338	0,0730	0,8156	0,308	0,294	0,4302	1,064

Tabla 7: Estudio de asociación de los SNPs de IL15 e IL15RA. ¹ Coordenadas del ensamblaje del genoma humano GRCh 38. ² Alelo de menor frecuencia en negrita. ³ Los valores de asociación significativa ($p < 0,05$) se muestran en rojo. Cr, cromosoma; SNP, polimorfismo de un único nucleótido; MAF, frecuencia del alelo menor; EC, enfermos celíacos; OR, *odds ratio*; IL, interleucina.

A continuación, se hizo un genotipado de un total de 12 pacientes celíacos para los que había disponibles datos de expresión de ARNm y proteína, obtenidos por PCR cuantitativa y *western blot*, respectivamente. Los pacientes fueron 5 niños celíacos en actividad, 4 celíacos adultos en actividad y 3 pacientes con EC refractaria. Los datos se contrastaron por correlación no paramétrica de Spearman y por el test de Mann-Whitney (no paramétrico), para observar las diferencias entre los diferentes genotipos, los alelos o la condición de ser portador de uno u otro alelo.

Tanto en el *western blot* de IL-15 como en el de IL-15R α , se detectan dos bandas de pesos moleculares aproximados de 40 y 56 KDa (fig. 9), puesto que, como se ha descrito, ambas proteínas se acoplan en el retículo endoplasmático para continuar por la vía secretora¹³³. La banda de 56 KDa es la que corresponde al complejo IL-15/IL-15R α que aparece en la membrana plasmática¹³³ (fig. 9).

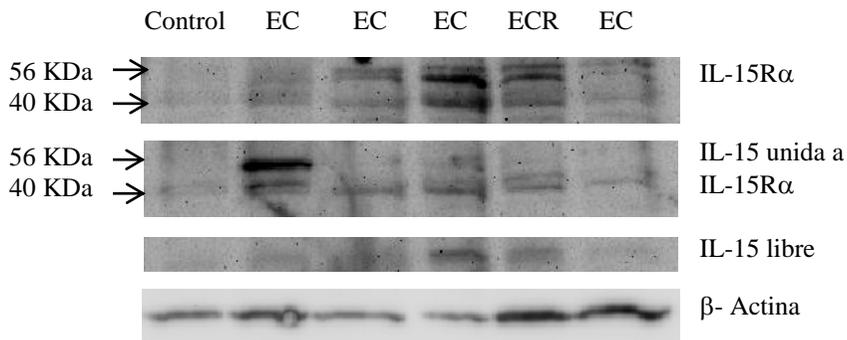


Figura 9: *Western blot* representativo de IL-15R α , IL-15 y β -actina. Las bandas de 56 y 40 KDa aparecen tanto en el *western blot* de IL-15 como en el de IL-15R α . EC, paciente con enfermedad celíaca; ECR, paciente con EC refractaria.

Al analizar los datos mediante la correlación de Spearman, no se obtuvieron correlaciones significativas de los polimorfismos con los genotipos o con el hecho de ser portador de alguno de los alelos. Por el contrario, sí se obtuvieron datos significativos para los pacientes ECR al correlacionar con

los alelos (tabla 8); uno de los cuales ya habíamos asociado con la EC (rs4956400).

ALELOS						
Cr	Gen	SNP	Alelos ¹	Parámetro	Coef.	p
4	<i>IL15</i>	rs4956400 #	C:T	B40KDa IL15R α	0,8165	0,0474
				IL15R α total	0,8165	0,0474
				Ratio IL15R α	-0,8165	0,0474
4	<i>IL15</i>	rs17701271	A:C	B56KDa IL15	-0,8165	0,0474
				IL15 total	-0,8165	0,0474
				Ratio IL15	-0,8165	0,0474
10	<i>IL15RA</i>	rs8177667	A:C	B40KDa IL15	-0,8165	0,0474
				B56KDa IL15R α	0,8165	0,0474

Tabla 8: Correlación de Spearman entre los datos de alelos con la expresión de IL-15 e IL-15R α de los pacientes celíacos refractarios. Se tomó como correlación significativa un valor de $p < 0,05$. ¹ Alelo de menor frecuencia en negrita.

Polimorfismos asociados significativamente con la enfermedad celíaca en el estudio previo. Cr, cromosoma; SNP, polimorfismo de un único nucleótido; Coef., coeficiente de correlación Rho de Spearman; IL, interleucina; B, banda; KDa, kilodaltons.

A continuación, se analizaron conjuntamente todos los pacientes celíacos en actividad, observándose una correlación entre 8 SNPs de *IL15* y 6 SNPs de *IL15RA* con la expresión de IL-15 y/o IL-15R α (tablas 9 y S1).

Este es el caso de los SNPs rs4371699, rs9994828, rs9996010, rs1389098 y rs1987968, pertenecientes a la región estudiada de *IL15*, y que correlacionan significativamente con su genotipo, su alelo o el hecho de ser portador de un alelo, con los niveles de ARNm o de proteína de IL-15; así como de los SNPs rs8177700, rs8177694, rs8177692 y rs8177667 del gen *IL15RA*, que correlacionan con los niveles de IL-15R α (tabla 9). Además, los SNPs rs11100722 y rs4956400, que se asociaron significativamente con la EC (tabla 7), muestran aquí una correlación con los niveles de expresión de proteína de IL-15 en la banda de 56 KDa (tabla 9).

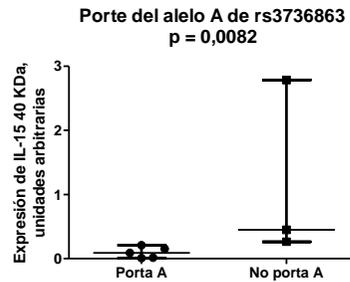
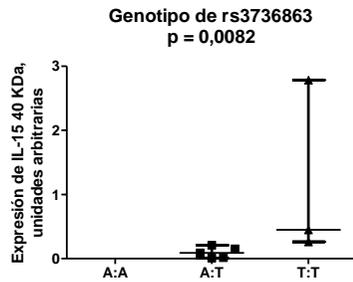
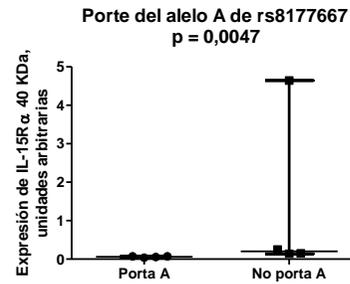
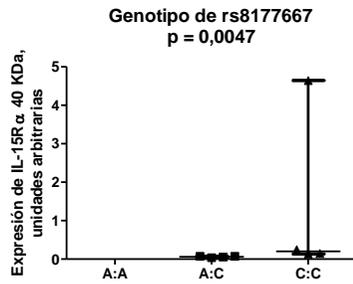
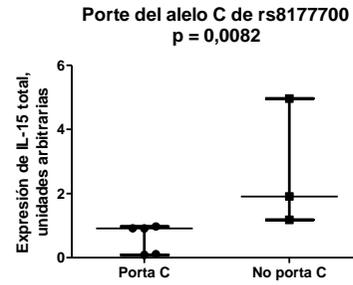
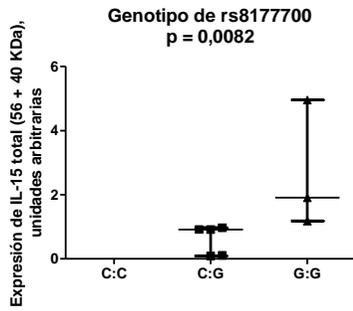
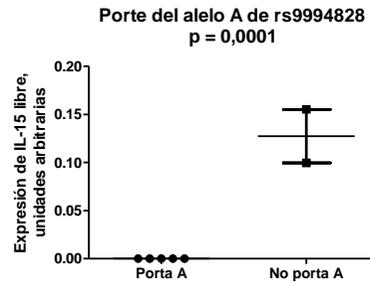
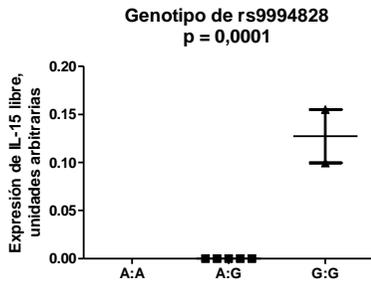
En muchos casos, se ha observado también una correlación significativa entre los polimorfismos de un gen con los niveles de expresión del otro gen (tabla 9), por lo que la regulación de ambos genes podría estar relacionada. Los SNPs con un valor de p menor que 0,01 se muestran en la figura 10.

Además, al comparar los resultados de los pacientes con ECR con los de los pacientes con EC en actividad, se observa que el SNP rs17701271 no resulta significativo en estos últimos y, por otra parte, las correlaciones de rs4956400 y rs8177667 son diferentes en ambos grupos de pacientes (tablas 8 y 9). El primero de ellos correlaciona en ECR con el valor del ratio de IL-15, la banda de 40KDa de IL-15R α y la cantidad total de IL-15R α , mientras que en pacientes EC en actividad correlaciona con la banda de 56KDa de IL-15. Rs8177667, por su parte, correlaciona en pacientes ECR con la expresión de la banda de 40KDa de IL-15 y la banda de 56KDa de IL-15R α , mientras que en pacientes celíacos en actividad lo hace únicamente con la banda de 40KDa de IL-15R α a nivel de genotipo, alelo o al ser portadores del alelo A (tablas 8 y 9).

Cr	Gen	SNP	Alelos ¹	GENOTIPOS			ALELOS			PORTADORES			
				Parámetro	Coef.	p	Parámetro	Coef.	p	Alelo	Parámetro	Coef.	p
4	<i>IL15</i>	rs4956400 #	C:T				B56KDa IL15	0,5714	0,0328				
4	<i>IL15</i>	rs4371699	A:C				ARNm <i>IL15</i> B56KDa IL15	0,5040 -0,5591	0,0465 0,0244				
4	<i>IL15</i>	rs11100722 #	C:G				B56KDa IL15	0,5455	0,0288	C	B56KDa IL15	-0,7325	0,0388
4	<i>IL15</i>	rs9994828	A:G	IL15 libre	0,9860	0,0001				A	IL15 libre	-0,9860	0,0001
				B56KDa IL15R α	-0,7906	0,0343				A	B56KDa IL15R α	0,7906	0,0343
				IL15R α total	-0,7906	0,0343				A	IL15R α total	0,7906	0,0343
4	<i>IL15</i>	rs7663689	C:T	ARNm IL15R α	0,7559	0,0300				T	ARNm IL15R α	0,7559	0,0300
4	<i>IL15</i>	rs9996010	A:G	ARNm IL15R α IL15 libre	0,7559 0,7377	0,0300 0,0367				A A	ARNm IL15R α IL15 libre	-0,7559 -0,7377	0,0300 0,0367
4	<i>IL15</i>	rs1389098	C:T				ARNm <i>IL15</i>	0,5002	0,0485				
4	<i>IL15</i>	rs1987968	A:G							G	IL15 libre	-0,7559	0,0300
10	<i>IL15RA</i>	rs8177700	C:G	IL15 total	0,8452	0,0082				C	IL15 total	-0,8452	0,0082
				B56KDa IL15R α	0,7325	0,0388				C	B56KDa IL15R α	-0,7325	0,0388
				IL15R α total	0,7325	0,0388				C	IL15R α total	-0,7325	0,0388
10	<i>IL15RA</i>	rs8177694	A:C	B40KDa IL15R α	-0,7303	0,0397	IL15 ratio IL15	0,5002	0,0485				
							B40KDa IL15R α	-0,5591	0,0244				
							IL15R α total	-0,5002	0,0485				

10	<i>IL15RA</i>	rs8177692	A:G	B40KDa IL15	-0,7559	0,0300			G	B40KDa IL15	-0,7559	0,0300	
				Ratio IL15	0,7559	0,0300			G	Ratio IL15	0,7559	0,0300	
				B56KDa IL15R α	-0,7559	0,0300			G	B56KDa IL15R α	-0,7559	0,0300	
				B40KDa IL15R α	-0,7559	0,0300			G	B40KDa IL15R α	-0,7559	0,0300	
				IL15R α total	-0,7559	0,0300			G	IL15R α total	-0,7559	0,0300	
10	<i>IL15RA</i>	rs8177667	A:C	B40KDa IL15R α	0,8729	0,0047	B40KDa IL15R α	0,5040	0,0465	A	B40KDa IL15R α	-0,8729	0,0047
10	<i>IL15RA</i>	rs3736863	A:T	B40KDa IL15	0,8452	0,0082			A	B40KDa IL15	-0,8452	0,0082	
				Ratio IL15	-0,8452	0,0082			A	Ratio IL15	0,8452	0,0082	
10	<i>IL15RA</i>	rs8177655	C:T	ARNm IL15	0,7559	0,0300			T	ARNm IL15	0,7559	0,0300	

Tabla 9: Correlación de Spearman entre los datos de genotipos, alelos o condición de ser portador de un alelo con la expresión de IL-15 e IL-15R α de los pacientes celíacos en actividad (incluyendo celíacos infantiles y adultos). Se tomó como correlación significativa un valor de $p < 0,05$. ¹ Alelo de menor frecuencia en negrita. # Polimorfismos asociados significativamente con la enfermedad celíaca en el estudio previo. Cr, cromosoma; SNP, polimorfismo de un único nucleótido; Coef., coeficiente de correlación Rho de Spearman; IL, interleucina; B, banda; KDa, kilodaltons; ARNm, expresión del ácido ribonucleico mensajero.



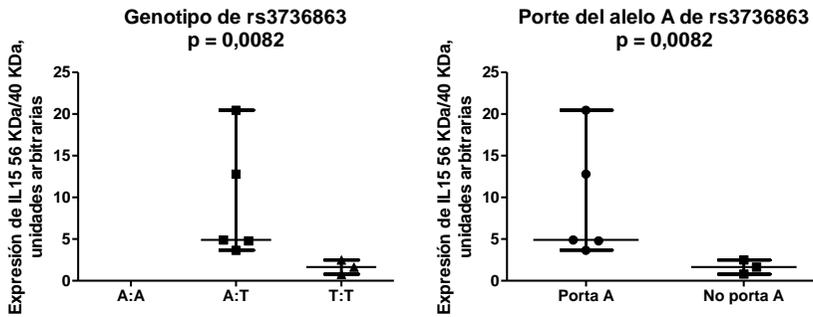
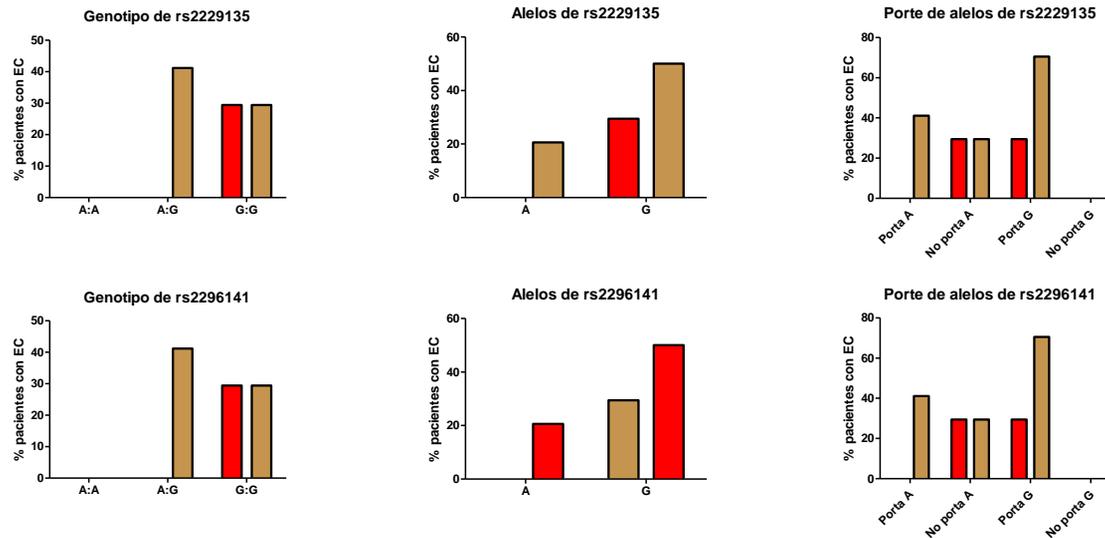


Figura 10: Representación gráfica de los genotipos (izquierda) y portes (derecha) de los polimorfismos que correlacionan con la expresión de IL-15 o IL-15R α con un valor de p menor que 0,01. Se indican la mediana y el rango.

Por último, decidimos analizar la existencia de correlaciones entre grupos de pacientes EC diagnosticados en la infancia (EC infantiles, n=5) respecto a los pacientes EC diagnosticados en la edad adulta (EC adultos en actividad y ECR que sabemos que su diagnóstico fue en la edad adulta, n=12). Como se puede observar en la tabla 10, estos pacientes se diferencian en 4 SNPs que forman parte del gen *IL15RA* a nivel intrónico (rs2296141, rs3136614 y rs3181148) o en la región 3'UTR (rs2229135). El análisis mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney se muestra en la tabla S2 y su representación gráfica en la figura 11.

Cr.	Gen	SNP	Alelos ¹	GENOTIPOS		ALELOS		PORTADORES		
				Coef.	p	Coef.	p	Alelo	Coef.	p
10	<i>IL15RA</i>	rs2229135	A: G	-0,5401	0,0252			A	0,5401	0,0252
10	<i>IL15RA</i>	rs2296141	A: G	-0,5401	0,0252			A	0,5401	0,0252
10	<i>IL15RA</i>	rs3136614	C: T	-0,5622	0,0234	-0,3612	0,0423	C	0,5774	0,0192
10	<i>IL15RA</i>	rs3181148	A: G			0,3873	0,0236			

Tabla 10: Correlación de Spearman entre los datos de genotipos, alelos o condición de ser portador de un alelo con el momento de diagnóstico de los pacientes celiacos (en la edad infantil o en la edad adulta). Se tomó como correlación significativa un valor de $p < 0,05$. ¹ Alelo de menor frecuencia en negrita. Cr, cromosoma; SNP, polimorfismo de un único nucleótido; Coef., coeficiente de correlación Rho de Spearman; IL, interleucina.



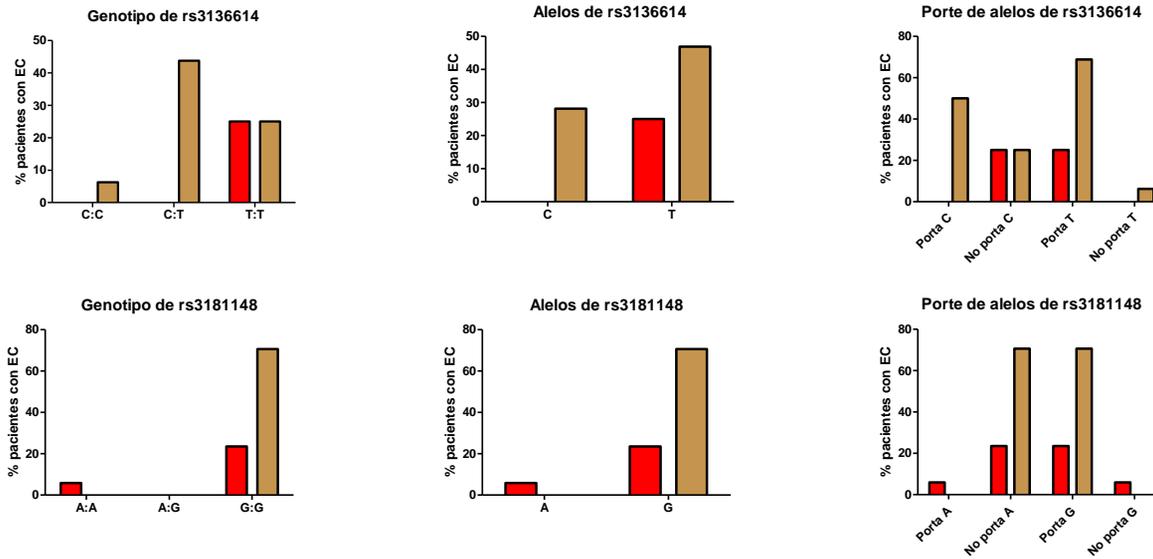


Figura 11: Representación gráfica de los genotipos (izquierda), alelos (centro) y portes de alelos (derecha) de los polimorfismos que correlacionan significativamente con el momento de diagnóstico de los pacientes celiacos. Los pacientes celiacos diagnosticados durante la infancia se muestran en rojo; los pacientes celiacos diagnosticados durante la edad adulta se muestran en marrón. EC, enfermedad celiaca.

2. DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES DE *SPLICING* ALTERNATIVO DE IL-15R α EN EL EPITELIO INTESTINAL HUMANO USANDO COMO MODELO LAS CÉLULAS CACO-2

Tras aislar ARN de células Caco-2 cultivadas en placas de 10 mm de diámetro con *RNeasy Mini Kit*, se realizó la retrotranscripción y PCR específicas para las variantes ya descritas de IL-15R α . Se habían registrado 5 entradas en la base de datos de nucleótidos del NCBI para ARN humano de IL-15R α ; una de ellas fue descartada del estudio por tratarse de una variante no codificante (NR_046362.1). Las características del resto de variantes de transcripción se describen en la figura 12. La variante de mayor longitud es la 4; las variantes 1 y 2 se diferencian de ésta por la falta de un exón de 153 pb. La variante 2 es la única que carece del tercer exón, mientras que la variante 3 se difiere del resto por poseer un exón inicial alternativo carente de inicio de transcripción y cuyo inicio de CDS se encuentra en el siguiente exón. Las proteínas a las que dan lugar son NP_002180.1, de 267 aa para la variante 1; NP_751950.2, de 234 aa para la variante 2; NP_001230468.1, de 231 aa para la variante 3 y NP_001243694.1, de 353 aa para la variante 4.

Se amplificaron las regiones codificantes en tres PCR específicas, para las variantes 1 y 2, para la variante 3 y para la variante 4 (tabla 2). El ADN se aisló por extracción tras una electroforesis en gel de agarosa (fig. 13) y se clonó en el vector pCRTM2.1-TOPO® (fig. S1). Los resultados fueron verificados con una nueva PCR.

Variante 1: NM_002189.3, 1647 pb, CDS: 120-923



Variante 2: NM_172200.2, 1548 pb, CDS: 120-824



Variante 3: NM_001243539.1, 1851 pb, CDS: 432-1127



Variante 4: NM_00125676.5, 1810 pb, CDS: 15-1076



Figura 12: Alineamiento de las cuatro variantes de transcripción codificantes descritas para IL-15R α . Las regiones fuera del CDS se muestran en gris. La variante más larga es la 4. Las variantes 1 y 2 se diferencian de la variante 4 por un exón de 153 pb. La variante 2 es la única que carece del tercer exón. La variante 3 se difiere del resto por poseer un exón inicial alternativo carente de inicio de transcripción. pb, pares de bases; CDS, secuencia codificante de ADN; E, exón.

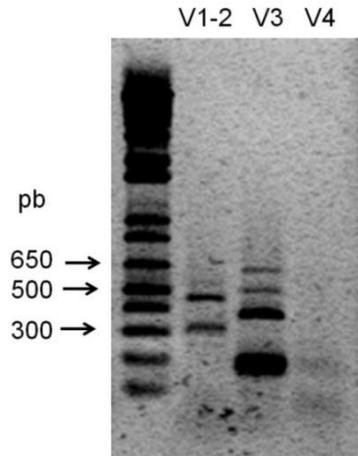


Figura 13: Productos de amplificación de los transcritos codificantes de IL-15R α a partir de ARN de células Caco-2. El carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular. Se obtuvieron bandas de amplificación para las variantes 1, 2 y 3, en un rango de 300 a 650 pb, aproximadamente. V, variante; pb, pares de bases.

Tras analizar las secuencias, se observó que la banda de menor peso molecular aislada de la PCR para la variante 3 era una secuencia inespecífica del cromosoma 9; el resto de las bandas corresponden a secuencias derivadas de IL-15R α . Las bandas aisladas de las variantes 1 ó 2 corresponden a una sub-variante de 510 pb que se compone de los exones 1, 4, 5, 6 y 7; y otra sub-variante de 276 pb que consta de los exones 1, 6 y 7. Por su parte, las sub-variantes aisladas de la tercera variante son menores del peso molecular que aparece en el gel de agarosa ya que los cebadores *forward* se diseñaron aguas arriba del codón de inicio debido a que se producía una escasa amplificación de productos con el cebador *forward* que anillaba en el codón de inicio (datos no mostrados), quizá por el alto contenido de CG en la secuencia. Las sub-variantes aisladas a partir de la variante 3 cuentan con una longitud (a partir del codón de inicio) de 498, 348 y 130 pb; cuya composición consta de los exones 2, una parte del 4 y los exones 6 y 7; de los exones 4 a 7 y de los exones 6 (en parte) y 7, respectivamente (fig. 14). Las proteínas que se predicen a partir de estas secuencias tienen características variadas y pesos moleculares desde 1,49 a 17,98 KDa (tabla 11 y fig. S4 y S5).

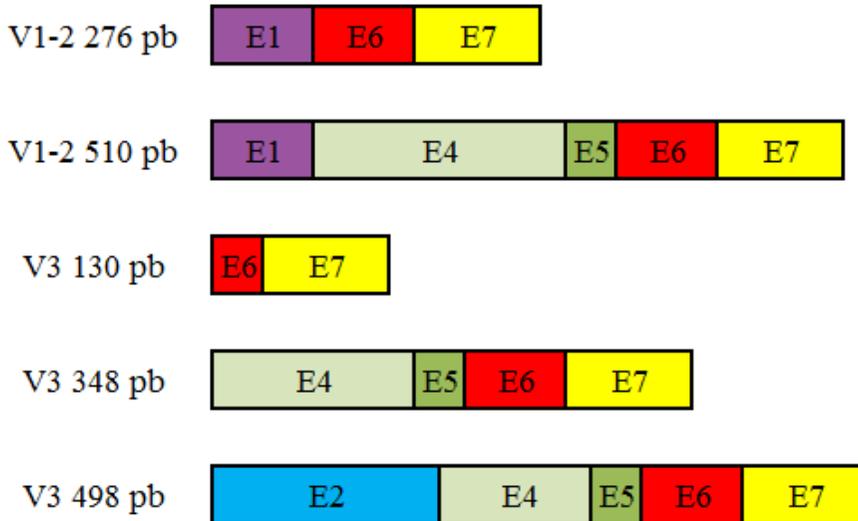


Figura 14: Esquema de las variantes de *splicing* de IL-15R α de las células Caco-2. Se aislaron cinco variantes, dos de ellas de la reacción de amplificación para las variantes 1 y 2, y tres de la reacción para la variante 3. La variante de 276 pares de bases (pb) aislada a partir de la variante 1 o 2 carece de los exones 2 a 5; la variante V1-2 510 pb, carece de los exones 2 y 3. De los productos derivados de la tercera variante (cuya secuencia codificante comienza en el segundo exón), el menor de ellos sólo está formado por una zona parcial del exón 6 y el exón 7. El producto de 348 pb carece de los exones 2 y 3 y, por último, el mayor de los productos contiene el exón 2, aunque carece del exón 3 y parte del 4.

Isoformas predecidas

Variante	Residuos (aa)	PI	Pm (KDa)
V1-2 276 pb	91	8,361	9,87
V1-2 510 pb	169	6,922	17,65
V3 130 pb *	14	11,048	1,49
V3 130 pb **	27	4,224	3,06
V3 348 pb	115	5,442	12,14
V3 498 pb	165	6,746	17,98

Tabla 11: Características de los productos proteicos predichos. * Proteína predecida a partir del primer ATG que aparece en la secuencia. ** Proteína predecida a partir del segundo ATG que aparece en la secuencia. aa, aminoácidos; PI, punto isoelectrico; Pm, peso molecular; KDa, kilo Daltons; V, variante, pb, pares de bases.

Sabiendo que el receptor IL-15R α se compone de un péptido señal (exón 1), el dominio Sushi o de unión con IL-15 (exón 2), el dominio enlace o *linker* (exón 3), dos dominios ricos en treonina y prolina (exones 4 y 5), un dominio transmembranal (exón 6) y otro citoplasmático (exón 7); la única sub-variante que sería capaz de competir por la IL-15 sería la de 498 pb (variante 3), ya que contiene los dos aminoácidos con los que interacciona IL-15 (ácido glutámico en la posición 7 y asparagina en la posición 24); sin embargo, no contiene todo el módulo de control de proteínas del complemento ya que carece de los primeros aminoácidos del exón 2 (fig. 15).

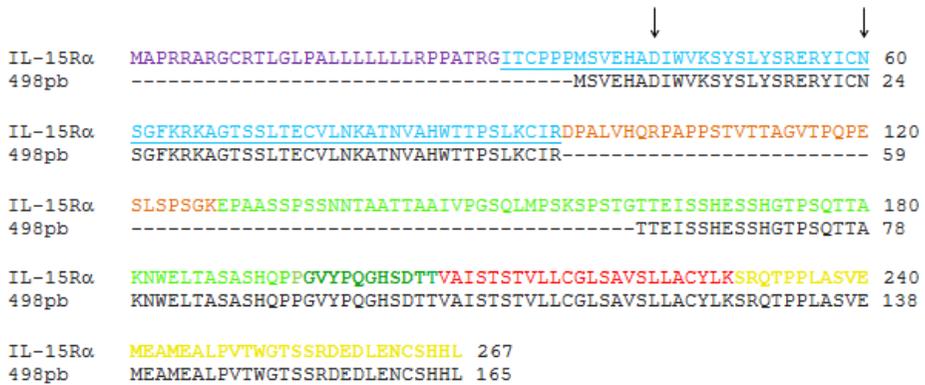


Figura 15: Alineamiento de la secuencia de la proteína predecida para la sub-variante de 498 pb con la secuencia completa de IL-15R α . Se resaltan con diferentes colores las secuencias correspondientes a cada exón: en morado el péptido señal, en azul el dominio Sushi, en marrón el dominio de enlace, en verde los dos dominios ricos en prolina y treonina, en rojo el dominio de transmembrana y en amarillo el citoplasmático. El módulo de control de proteínas del complemento aparece subrayado y los aminoácidos de unión a IL-15 señalados con flechas (ácido glutámico y asparagina). pb, pares de bases; IL, interleucina.

Una vez caracterizadas, las sub-variantes fueron subclonadas en el vector pEGFP-N1 (fig. S2), de tal manera que fuese fácilmente detectable al expresar la sub-variante seguida por la proteína EGFP (tabla 3). Las secuencias introducidas fueron verificadas por secuenciación. A continuación, el vector fue transfectado a las células Caco-2 utilizando *Lipofectamine LTX*

and Plus Reagent de manera inversa. Tras 48-72 h, las células fueron preparadas para inmunofluorescencia o fueron lisadas con el *buffer* RIPA para extraer sus proteínas y analizarlas por *western blot*. Ambos análisis se realizaron por duplicado.

Se consiguieron transfecciones con éxito para todas las sub-variantes excepto para la de 498 pb derivada de la variante 3 (fig. 16 y 17). Como se puede observar en el *western blot* para EGFP (fig. 16), en las células transfectadas con el plásmido sin inserto sólo se detecta una banda a 32,7 KDa, que corresponde con la proteína EGFP. En las células transfectadas con las sub-variantes, a excepción de V3 498 pb, se muestra otra banda adicional de mayor peso molecular, que corresponde a la suma de pesos moleculares de la proteína EGFP con las distintas proteínas predichas: V1-2 276 pb presenta una banda de 42,6 KDa; V1-2 510 pb presenta una banda de 50,4 KDa y V3 348 pb, una de 44,8 KDa (tabla 11 y fig. 16). Por su parte, V3 130 pb parece expresar una banda de 35,8 KDa; es decir, la predicha a partir de su segundo codón de inicio, ATG (fig. 16).

En cuanto a su localización, la proteína EGFP parece distribuirse homogéneamente en el citoplasma. En cambio, las sub-variantes, además de esta distribución, se presentan como acumulaciones granulosas (fig. 17). Al evaluar la localización en diferentes orgánulos, las sub-variantes parecen co-localizar levemente con el retículo endoplasmático, apreciándose mejor con las variantes V1-2 276 pb y V3 348 pb; sin embargo, también se observa una ligera co-localización en las células transfectadas con el plásmido sin inserto. Utilizando anticuerpos dirigidos a proteínas del aparato de Golgi y los lisosomas no se observa co-localización en ninguno de los casos (fig. 17).

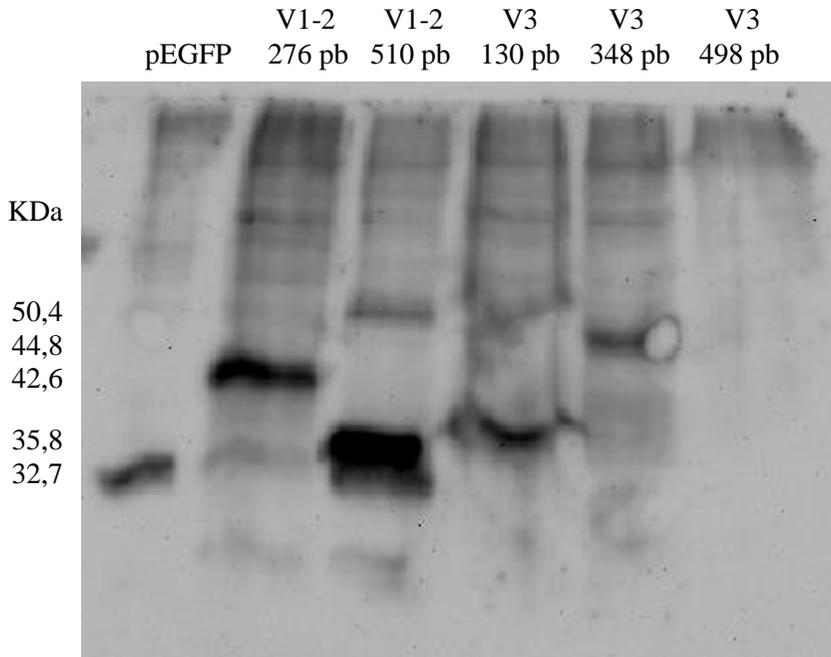
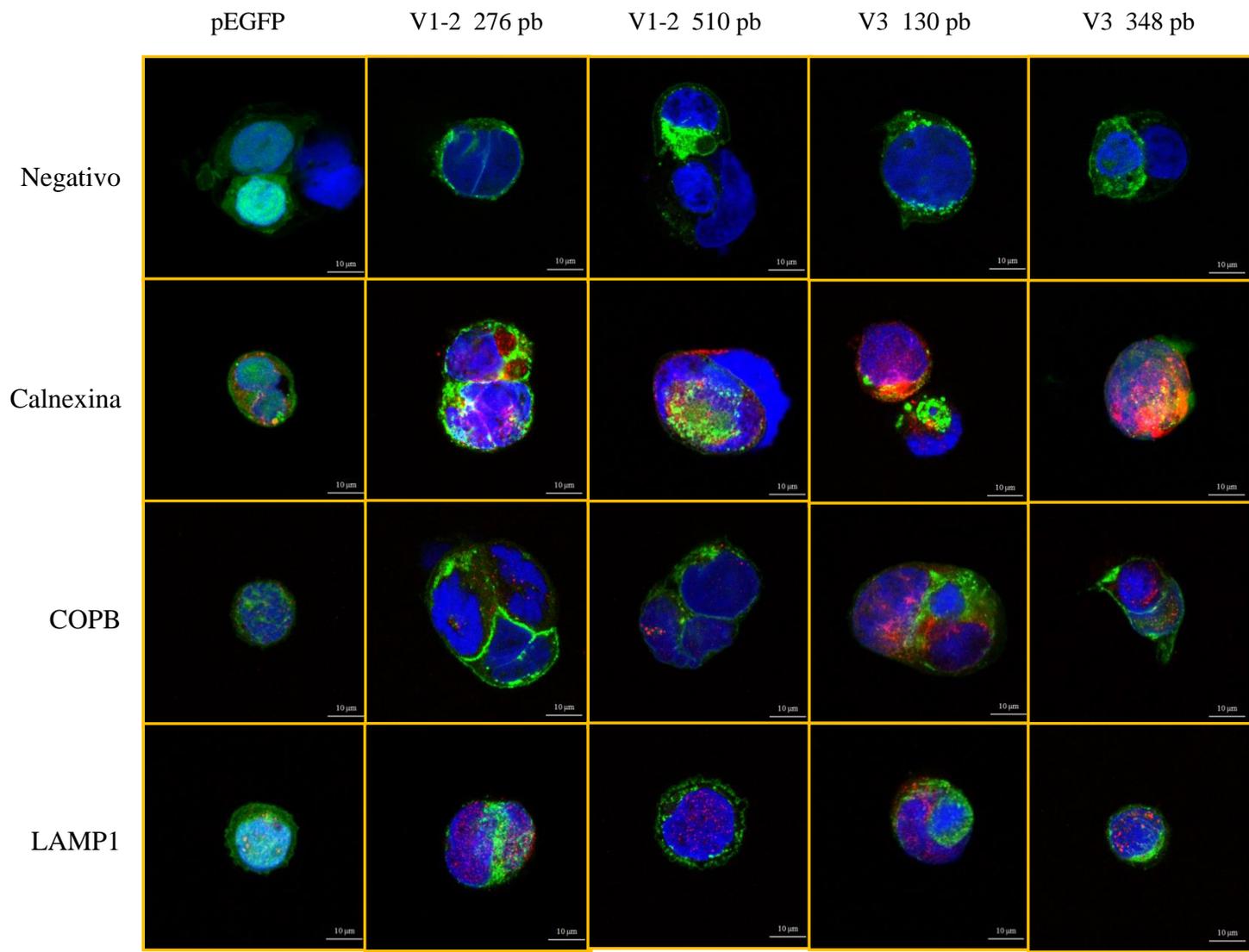


Figura 16: *Western blot* para la proteína fluorescente verde mejorada, EGFP, de proteínas de células Caco-2 transfectadas con las diferentes variantes obtenidas del receptor de la interleucina (IL)-15, IL-15R α . Se muestra el peso molecular aproximado a la izquierda expresado en kiloDaltons (KDa). pEGFP, células transfectadas con el plásmido vacío; V, variante; pb, pares de bases.

► **Figura 17:** Inmunofluorescencia de células Caco-2 transfectadas con pEGFP (control), las subvariantes de 276 y 510 pares de bases (pb) derivadas de las variantes (V) 1 y 2; y las subvariantes de 130 y 348 pb derivadas de la tercera de ellas. Se muestran en azul los núcleos teñidos con DAPI, en verde las proteínas fusionadas a EGFP y en rojo la tinción con anticuerpo específico para calnexina (retículo endoplasmático), para la proteína del coatómero B (COPB, aparato de Golgi), para la proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (LAMP1, lisosomas) o en ausencia de anticuerpo (negativo).



A continuación, se quiso valorar la regulación del ADN de IL-15R α por metilación, puesto que se ha descrito que puede afectarse de forma específica en cada tejido ¹⁴⁰. Para ello se cultivaron las células Caco-2 en presencia de 5' aza-2'-desoxicitidina (AZA), inhibidor de la ADN metiltransferasa, durante 24 y 48 horas a una concentración de 0,1; 1 y 10 μ M. A continuación, se extrajo el ARN, se retrotranscribió y se realizaron PCR cuantitativas con cebadores específicos para cada variante (tabla 5). Para dos de las sub-variantes derivadas de la variante 3, 130 pb y 348 pb, no fue posible el diseño de cebadores específicos debido a que sus secuencias se engloban en otras de las variantes, por lo que se analizaron por PCR convencional y densitometría del gel de agarosa (fig. 13). En todos los casos se utilizó GADPH como gen de referencia. La inhibición con AZA se realizó por duplicado y las reacciones de PCR por triplicado.

Como se puede observar en la figura 18, la ausencia de metilación del ADN aumenta significativamente la expresión de todas las variantes, así como de la mayoría de las sub-variantes, especialmente a las 48 horas. En el caso de las dos sub-variantes cuantificadas por densitometría (fig. 18, paneles de la derecha), las variaciones, aunque estadísticamente significativas, no son tan destacables como para los casos anteriores e, incluso, la sub-variante de 348 pb disminuye su expresión.

De la misma manera, se estudió la expresión de las diferentes variantes y sub-variantes de IL-15R α en biopsias procedentes tanto de pacientes celíacos como de controles (fig. 19). Sin embargo, se observó una gran variabilidad entre pacientes, por lo que las únicas diferencias estadísticamente significativas se encontraron al comparar los niños con EC respecto a los controles (variante 2) y los pacientes con ECR respecto a EC adultos en dieta sin gluten (variante 2 y sub-variante de 348 pb).

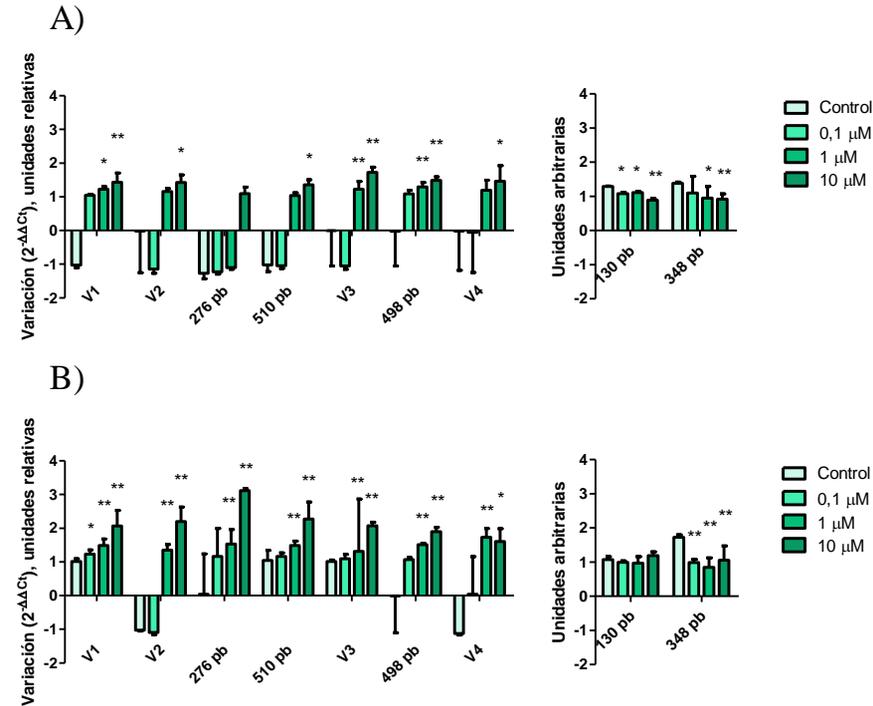


Figura 18: Representación de la mediana con rango intercuartil para la expresión de cada variante de IL-15R α en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de 5'-aza-2'-desoxicitidina durante 24 horas (A) o 48 horas (B). A la izquierda se representan las variantes y sub-variantes que fueron cuantificadas por PCR cuantitativa y a la derecha las que se cuantificaron por densitometría. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. V, variante; pb, pares de bases.

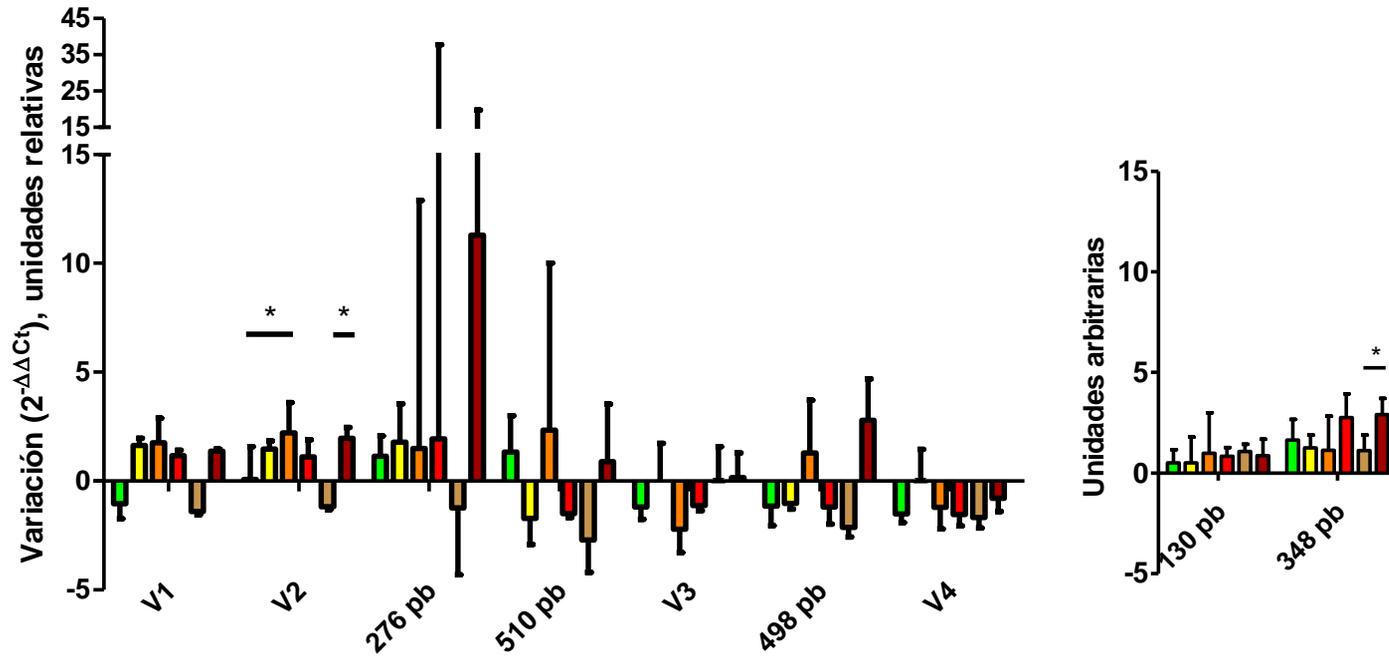


Figura 19: Representación de la mediana con rango intercuartil para la expresión de cada variante de IL-15R α en biopsias de pacientes control (n=13, verde), controles patológicos (n=7, amarillo), celíacos infantiles (n=9, naranja), celíacos adultos activos (n=7, rojo), celíacos adultos en dieta sin gluten (n=7, marrón) y pacientes con enfermedad celíaca refractaria (n=6, granate). A la izquierda se representan las variantes y subvariantes que fueron cuantificadas por PCR cuantitativa y a la derecha las que se cuantificaron por densitometría. * p < 0,05. V, variante; pb, pares de bases.

3. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE IL-15 E IL-15R α EN EL INTESTINNO HUMANO

En este estudio se utilizaron biopsias duodenales humanas con el fin de conocer los niveles de expresión de IL-15 y de su receptor por qPCR, *western blot* y citometría de flujo (tablas 12 y S3). Los genes de referencia fueron GADPH, para la qPCR, y β -actina, para el *western blot*. Para la relativización en qPCR se tomó la expresión media de cada molécula en el conjunto de biopsias duodenales control. Los datos fueron analizados con el test no paramétrico de Mann-Whitney y tomando como significativo un valor de p menor a 0,05.

	qPCR	<i>Western blot</i>	Citometría de flujo
Controles	12	17	9
Controles patológicos	12	14	2
EC infantil en actividad	7	8	-
EC adultos en actividad	5	8	3
EC adultos en DSG	9	10	2
EC refractaria	5	6	2
Total	50	63	18

Tabla 12: Relación de muestras utilizadas para cada técnica. qPCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; EC, enfermedad celiaca; DSG, dieta sin gluten.

Se realizó un análisis mediante qPCR de IL-15 y de otras moléculas implicadas en su señalización (IL-15R α , STAT3, STAT5A y STAT5B), además de las dos citocinas con las que solapa actividad (IFN- γ e IL-21). El análisis reveló un aumento significativo de IFN- γ en los grupos de niños

Resultados

celiacos y de adultos con EC refractaria, siendo mayor en los que padecían la forma refractaria de la enfermedad (aumento de 19,97 veces), en comparación con los controles tanto normales como patológicos (fig. 20). En los pacientes con ECR, también se detectó un aumento de 2,83 veces en los niveles de STAT5A y de 1,39 veces en los niveles de IL-15R α y, aunque de manera no significativa debido a una mayor variabilidad entre pacientes, se observa una tendencia al aumento de la expresión de ARNm de IL-21 (fig. 20). Esta variación en la expresión de IL-21 sí resultó significativa en los niños con EC (5,78 veces, fig. 20). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes celiacos adultos en actividad o en tratamiento; sin embargo, sólo en el grupo de EC en actividad se observa un aumento de la expresión de IL-15R α (2,89 veces) y de STAT3 (6,36 veces). Los niveles de ARNm de IL-15 y STAT5B no varían en ninguno de los grupos estudiados (fig. 20).

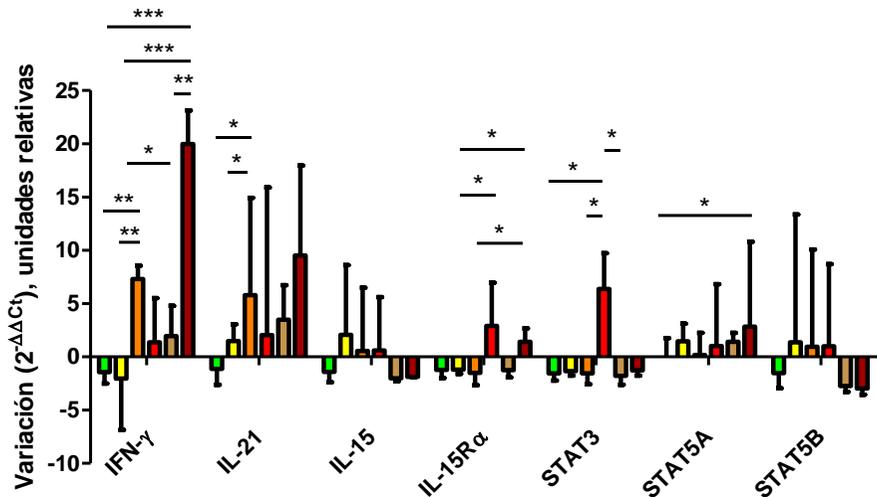


Figura 20: Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de ARNm de diferentes moléculas relacionadas con IL-15 en biopsias de controles (n = 12, verde), controles patológicos (n = 12, amarillo), pacientes celiacos infantiles (n = 7, naranja), pacientes celiacos adultos en actividad (n = 5, rojo), pacientes celiacos adultos en dieta sin gluten (n=9, marrón) y pacientes celiacos refractarios (n = 5, granate). Las columnas representan la mediana y las barras verticales el rango intercuartil. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. IFN, interferón; IL, interleucina; R, receptor; STAT, transductor de señal y activador de transcripción.

Al igual que en la qPCR, el estudio mediante *western blot* no muestra diferencias significativas en la expresión de IL-15 en su forma libre (fig. 21). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de celíacos, a excepción de la expresión en pacientes celíacos en DSG, que fue menor respecto a controles en las bandas de 56 y 40 KDa y menor respecto a celíacos infantiles en la banda de 56 KDa (fig. 21). Los niveles de proteína de IL-15 de los pacientes con ECR parecen ser similares a los pacientes EC infantiles, aunque no de manera significativa (fig. 21).

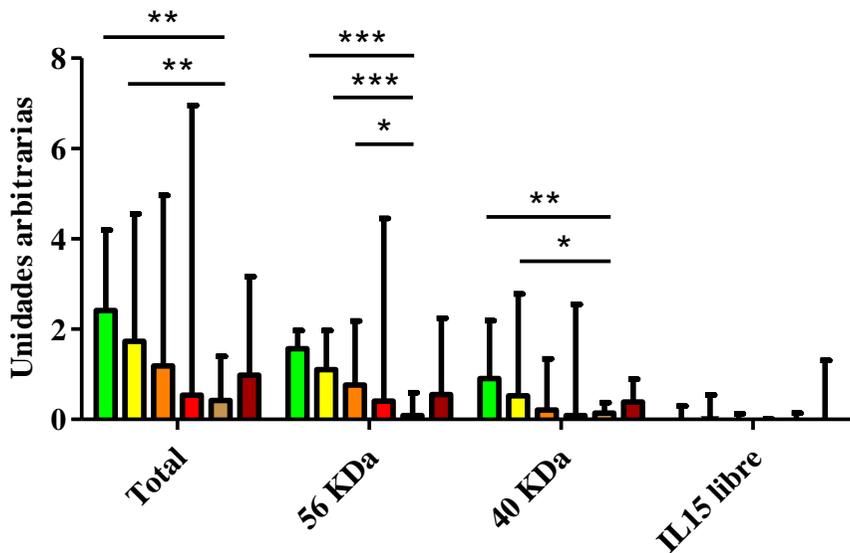


Figura 21: Expresión proteica de las bandas del *western blot* de IL-15. Se representa la mediana con el rango intercuartil. El total representa la suma de las bandas de 56 y 40 KDa; IL-15 libre representa la isoforma madura de IL-15. Se analizaron 17 muestras control (verde), 14 de controles patológicos (amarillo), 8 de pacientes celíacos infantiles (naranja), 18 de celíacos adultos (rojo) y 6 de celíacos refractarios (granate). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. KDa, kilodaltons; IL, interleucina.

Resultados

Por otra parte, el *western blot* de IL-15R α revela unos niveles significativamente mayores para los enfermos con ECR en ambas bandas respecto a los pacientes EC adultos en DSG (fig. 22). Igualmente, los niveles de IL-15R α fueron menores en pacientes EC adultos en DSG respecto a los controles; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el resto de grupos que se tuvieron en cuenta (fig. 22). Al ajustar las determinaciones con el ratio del valor de 56 KDa respecto al de la banda de 40 KDa, se puede observar un aumento estadísticamente significativo para la expresión de IL-15R α en los pacientes celíacos adultos en actividad respecto al grupo control (fig. 23).

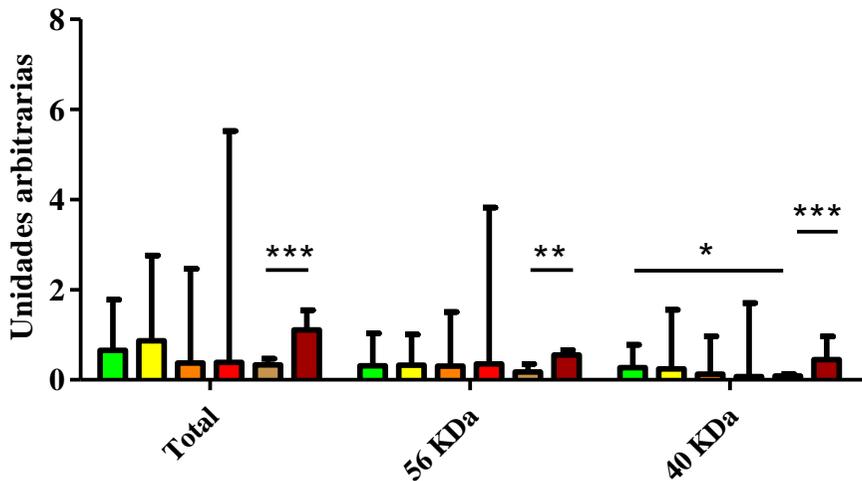


Figura 22: Expresión proteica de las diferentes bandas del *western blot* de IL-15R α . Se representa la mediana con el rango intercuartil. El total representa la suma de las bandas a 56 y 40 KDa. Se analizaron 17 muestras de controles (verde), 14 de controles patológicos (amarillo), 8 de pacientes celíacos infantiles (naranja), 18 de pacientes celíacos adultos (rojo) y 6 de pacientes celíacos refractarios (granate). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. KDa, kilodaltons; IL, interleucina; R, receptor.

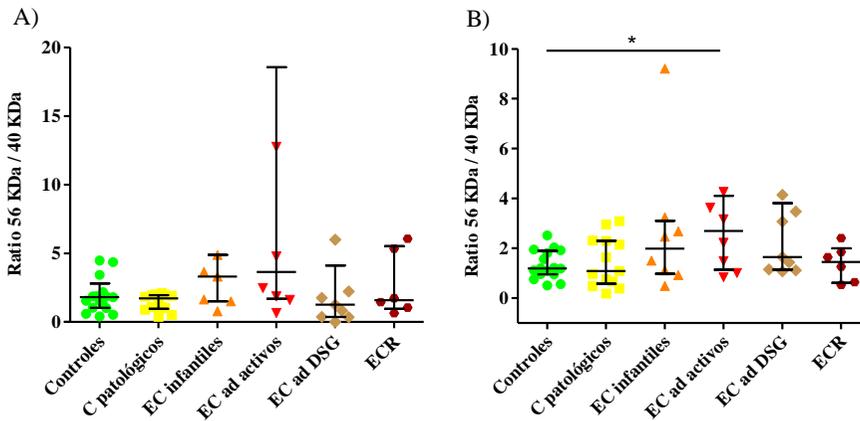


Figura 23: Ratio de la expresión proteica de la densidad de la banda de 56 KDa por la de 40 KDa en los *western blot* de IL-15 (A) e IL-15R α (B). Se analizaron 17 muestras de controles, 14 de controles patológicos (C patológicos), 8 de pacientes celíacos infantiles (EC infantiles), 18 de pacientes celíacos adultos y 6 de pacientes celíacos refractarios (ECR). Las barras horizontales indican la mediana y las verticales el rango intercuartil. * $p < 0,05$. KDa, kilodaltons; IL, interleucina; R, receptor.

La capacidad de estos parámetros de discernir entre grupos se muestra en la tabla 13. Como se puede observar, el análisis mediante el *western blot* de IL-15 permite distinguir los celíacos adultos en DSG de los controles y controles patológicos con las bandas de 40 y 56 KDa, así como con la suma de ambos. La banda de 56 KDa sirve también para distinguir a los niños celíacos de los pacientes con ECR.

En cuanto al *western blot* de IL-15R α , la banda de 40 KDa permite distinguir a los EC adultos en DSG de los controles y de los pacientes con ECR (para los pacientes con ECR es válida también la banda de 56 KDa) (tabla 13). La banda de 40 KDa es adecuada también para la distinción de los niños celíacos de los pacientes con ECR. Por último, el ratio de las dos bandas del *western blot* de IL-15R α permite diferenciar el grupo control de un celíaco adulto en actividad, aunque no de las otras presentaciones de la enfermedad (tabla 13).

Resultados

<i>Western blot,</i> parámetro	Grupos	ABC	p	Coordenada	Sens.	Espec.
IL-15, 56 KDa	Control- ECad DSG	0,8681	0,0027	0,80964259	81,30%	88,90%
IL-15, 40 KDa	Control- ECad DSG	0,8125	0,0108	0,39310241	75,00%	88,90%
IL-15, total	Control- ECad DSG	0,8333	0,0066	0,77960550	81,30%	66,70%
IL-15, 56 KDa	C patol- ECad DSG	0,8803	0,0030	0,81511462	84,60%	88,90%
IL-15, 40 KDa	C patol- ECad DSG	0,8034	0,0178	0,14002307	84,60%	55,60%
IL-15, total	C patol- ECad DSG	0,8205	0,0123	1,21248799	84,60%	77,80%
IL-15, 56 KDa	EC inf- ECad DSG	0,8413	0,0229	0,52791895	85,70%	77,80%
IL-15, 56 KDa	EC ad DSG- ECR	0,8148	0,0451	0,14144277	100,00%	66,70%
IL-15Rα, ratio	Control- ECad activos	0,7578	0,0433	1,34922703	75,00%	62,50%
IL-15Rα, 40 KDa	Control- ECad DSG	0,7986	0,0149	0,11824059	75,00%	77,80%
IL-15Rα, 40 KDa	C patol- ECad DSG	0,7521	0,0488	0,17570070	61,50%	88,90%
IL-15Rα, 40 KDa	EC inf-ECR	0,8333	0,0455	0,26724489	83,30%	85,70%
IL-15Rα, 56 KDa	ECad DSG- ECR	0,9074	0,0095	0,45316279	100,00%	88,90%
IL-15Rα, 40 KDa	ECad DSG- ECR	1,0000	0,0015	0,17570070	100,00%	100,00%
IL-15Rα, total	ECad DSG- ECR	1,0000	0,0015	0,65883819	100,00%	100,00%

Tabla 13: Análisis mediante *western blot* por curva COR. Se muestran los parámetros que resultaron significativos ($p < 0,05$) así como los grupos que fueron comparados. ABC, área bajo la curva; Sens., sensibilidad; Espec, especificidad; C patol, controles patológicos; EC, enfermedad celiaca, inf, pacientes infantiles; ad, pacientes adultos; DSG, dieta sin gluten; ECR, enfermedad celiaca refractaria, IL, interleucina; R, receptor; KDa, kilo daltons.

En un pequeño número de biopsias se analizó la presencia de IL-15 en la superficie de la membrana en células del epitelio intestinal (CD45-EpCAM+) por citometría de flujo (tabla 12 y fig. 24). El número de células epiteliales de los pacientes con ECR resultó significativamente menor que el observado en los casos control; aunque no fue así para los otros grupos de

pacientes celíacos (fig. 25A). Los niveles de IL-15 expresados en la superficie de las células epiteliales resultó de nuevo estadísticamente menor en los pacientes con ECR (fig. 25B). Los otros grupos de pacientes celíacos no mostraron diferencias significativas, aunque se observa una tendencia al aumento en los pacientes EC en DSG (fig. 25B). Por último, la proporción entre las células epiteliales que expresan IL-15 respecto al total, mostró un aumento significativo para los pacientes EC en DSG (fig. 25B, C). Estos parámetros se evaluaron también mediante una curva COR, siendo la detección más fiable la cuantificación del ratio de células epiteliales que expresan IL-15 respecto al total, con un valor de p de 0,0351 y un área bajo la curva de 0,9688 para la diferenciación de individuos EC en DSG respecto a todos los grupos restantes (controles, controles patológicos, EC en actividad y ECR). El punto de corte para identificar a un individuo como EC en DSG en todos los casos es de 0,125 células epiteliales que expresan IL-15 respecto del total de células epiteliales, con una sensibilidad del 100,00% y una especificidad del 93,70%.

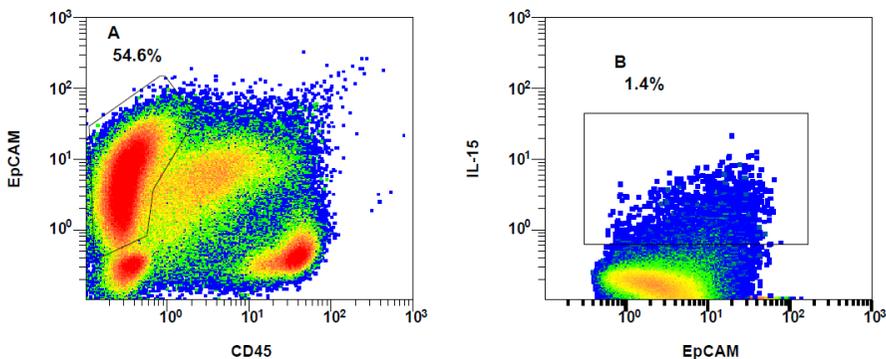


Figura 24: Diagrama de citometría de flujo representativo de la selección por CD45-EpCAM+ de células epiteliales (A) y, a la derecha, la cantidad de ellas que expresan IL-15 en su superficie (B). Los gráficos corresponden a un paciente control.

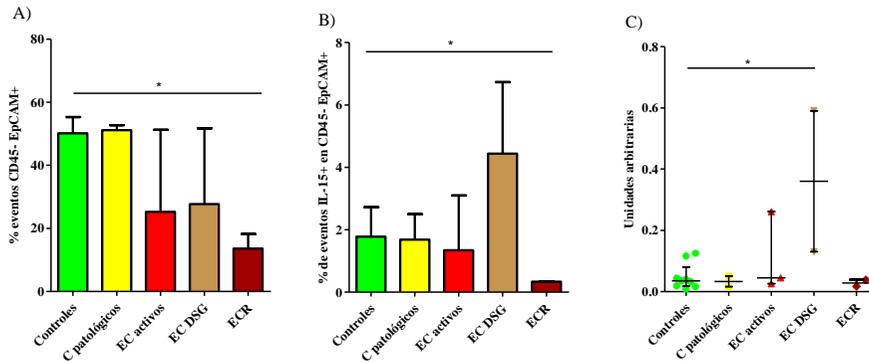


Figura 25: Cantidad de expresión de IL-15 en células epiteliales de la mucosa duodenal por citometría de flujo de superficie. (A) Porcentaje de eventos observados para células epiteliales, CD45- EpCAM+, respecto al total de células, (B) de células epiteliales que expresan IL-15 en su membrana, CD45- EpCAM+ IL-15+ y (C) ratio de células que expresan IL-15 en su membrana respecto al total de enterocitos. Se analizaron 9 muestras de pacientes control (verde), 2 de controles patológicos (C patológicos, amarillo), 3 de pacientes celíacos en actividad (EC activos, rojo), 2 de pacientes celíacos en dieta sin gluten (EC DSG, marrón) y 2 de pacientes celíacos refractarios (ECR, granate). Las barras indican la mediana y las líneas verticales el rango intercuartil.

Por último, los niveles de IL-15 en suero fueron cuantificados por ELISA en individuos sanos y pacientes con EC con y sin tratamiento (fig. 26). Los pacientes celíacos adultos resultaron tener unos niveles de IL-15 menores que en el grupo sano, independientemente de la dieta (fig. 26). Esta observación se repitió para los pacientes en edad pediátrica, aunque no alcanzaron niveles significativos. A pesar de que la concentración de IL-15 parece disminuir al seguir una dieta libre de gluten, los niveles encontrados en los niños celíacos son estadísticamente mayores entre los pacientes en DSG infantiles y adultos (fig. 26).

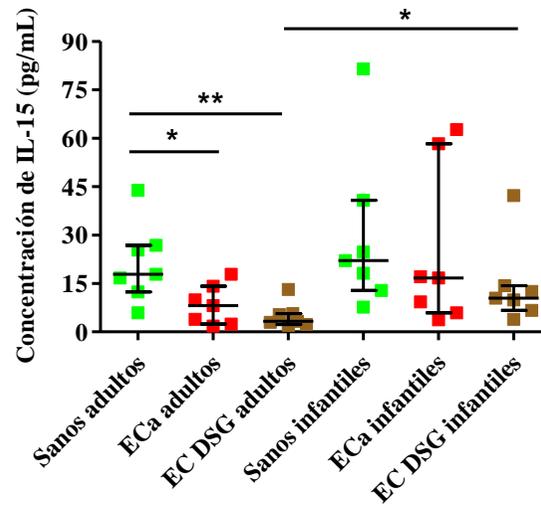


Figura 26: Concentración de IL-15 en suero de individuos sanos y celíacos. Las muestras proceden de individuos sanos, celíacos en actividad (ECa) o celíacos en dieta sin gluten (EC DSG) de edad adulta o pediátrica (infantiles). Se estudiaron 7 muestras de cada grupo. Las líneas horizontales representan la mediana y las barras verticales el rango intercuartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4. EFECTOS DE ESTÍMULOS COMUNES EN LA EC EN UN MODELO *IN VITRO* DE EPITELIO INTESTINAL, CÉLULAS CACO-2

Los péptidos derivados del gluten desencadenan y/o mantienen la inflamación intestinal en los pacientes celíacos¹⁹⁷. Sin embargo, los mecanismos por los cuales actúan las diferentes moléculas en cada tipo celular no están del todo esclarecidos. Las células epiteliales son las primeras expuestas a cualquier agente exógeno y, además, son capaces de generar una respuesta inmunológica. Por ello, nuestro interés se ha centrado en estas células, tomando como modelo el cultivo de la línea celular Caco-2.

Con el fin de valorar la integridad celular, cuantificada mediante la resistencia transepitelial o RTE, se cultivaron 50000 células en insertos de poliestireno con poro de 0,4 μm junto con citocinas que se encuentran sobreexpresadas en biopsias de pacientes celíacos (IL-15, IFN- γ o IL-21, 50 ng/mL) o péptidos inmunotóxicos para estos pacientes derivados de la α -gliadina (p31-49 o p57-89, 100 $\mu\text{g/mL}$) durante once días. El digerido de gliadina con pepsina-tripsina, PT-gliadina (1 mg/mL), se consideró como control positivo y las células sin añadidos como condición basal o control negativo. Cada ensayo se realizó por duplicado y se analizó mediante el test no paramétrico de Wilcoxon, tomando como significativo un valor de p menor de 0,05.

Como se puede observar en la figura 27, tras siete días de cultivo se pueden apreciar diferencias entre los controles positivo y negativo, ya que el crecimiento en presencia de PT-gliadina se retarda ($p=0,0313$). El crecimiento

de la monocapa tras añadir las citocinas y los péptidos, muestra un patrón similar al de PT-gliadina (fig.27). Los valores de p para los estímulos con IL-15, IFN- γ y p-57-89 respecto al control negativo fueron de 0,0313; sin embargo, los estímulos con IL-21 y con el péptido p31-49 no llegaron a alcanzar el valor de significación ($p=0,0625$ en ambos casos). En comparación con el resultado obtenido con la PT-gliadina, la IL-15, la IL-21, el IFN- γ y p31-49 no resultaron diferentes (valores de p de 0,5625; 0,0625; 0,3125 y 0,8438; respectivamente). Por otra parte, el péptido p57-89 tuvo unos efectos significativamente mayores que el resto de estímulos ($p=0,0313$ en todos los casos) (fig. 27).

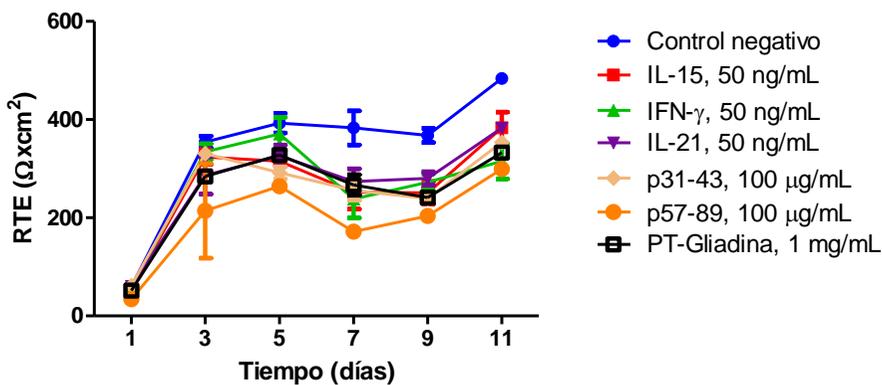
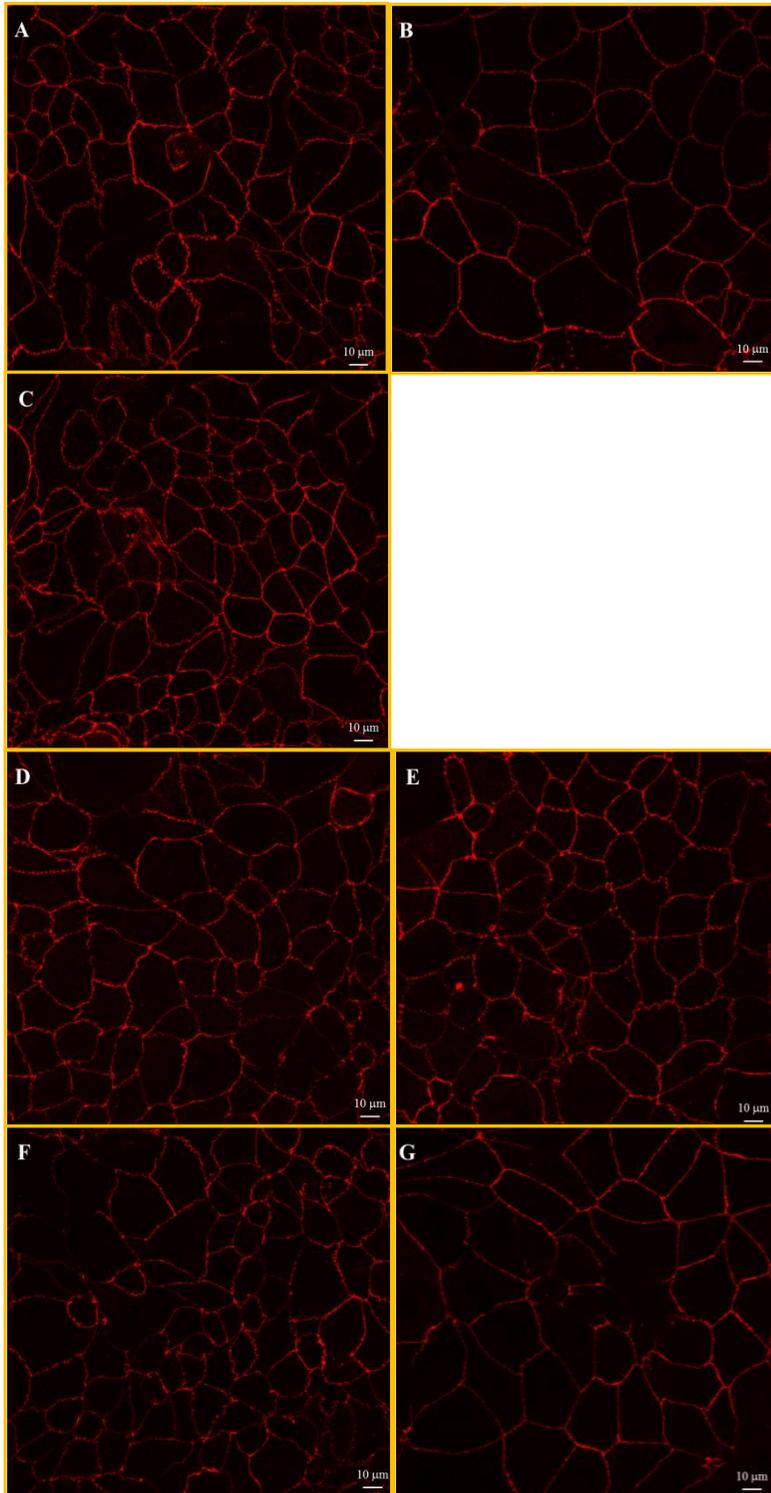


Figura 27: Evolución de la resistencia transepitelial (RTE) de las células Caco-2 en cultivo con citocinas (IFN- γ , IL-15 e IL-21), péptidos de gliadina (p31-49 y p57-89) y un digerido de gliadina con pepsina-tripsina (PT-gliadina) durante 11 días.

Para observar la morfología de las células y los efectos en las uniones estrechas, se realizó un análisis por inmunofluorescencia de la proteína *zonula occludens* (ZO)-1 (fig.28). La proteína ZO-1 interviene en la interacción entre la ocludina (proteína de las uniones estrechas, junto con claudina), con los filamentos de actina del citoesqueleto. Por tanto, las células Caco-2 se cultivaron en cristales de inmunofluorescencia en presencia de los estímulos anteriores por duplicado y, una vez formada la monocapa, se realizó la

inmunofluorescencia y se observaron a 40 aumentos en un microscopio confocal. En condiciones basales, estas células presentan interdigitaciones en la membrana plasmática (fig.28A); mientras que en presencia de PT-gliadina parecen tener un mayor tamaño y la membrana plasmática se encuentra estirada (fig.28B). Cuando las células fueron expuestas a las diferentes citocinas o al péptido p31-49, las células mantuvieron un tamaño intermedio, aunque mostraron un perfil de membrana mixto, en el que se pueden observar tanto células con la membrana normal como lisa (fig.28C-F). En presencia del péptido p57-89, el patrón es muy similar al observado con PT-gliadina: células amplias con membranas carentes de interdigitaciones (fig.28G).

► **Figura 28:** Imágenes de inmunofluorescencias de la proteína ZO-1 en las células Caco-2 en condiciones basales (A), en presencia de 1 mg/mL del digerido de pepsina-tripsina de gliadina (B), de 50 ng/mL de IL-15 (C), de IFN- γ (D) o de IL-21 (E), o de 100 μ g/mL del péptido p31-49 (F) o del péptido p57-89 (G). Se analizó la expresión de ZO-1 a lo largo del eje Z con un microscopio confocal Leica (objetivo 40x); realizando la proyección máxima de todos los cortes obtenidos.

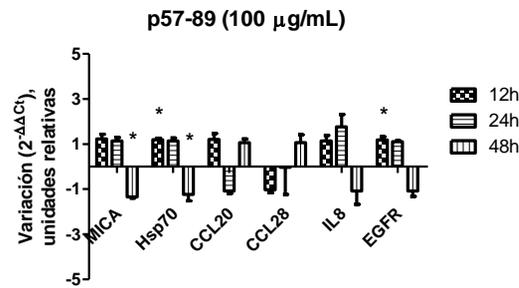
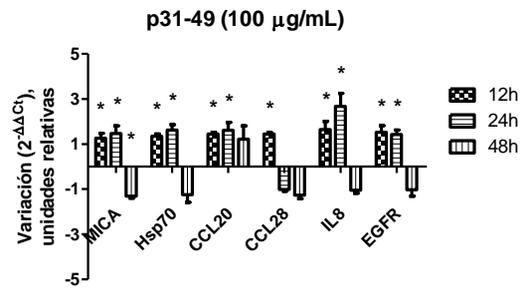
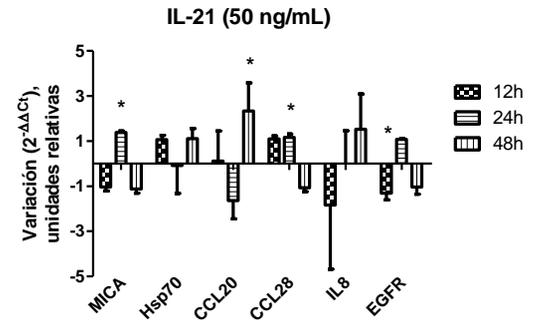
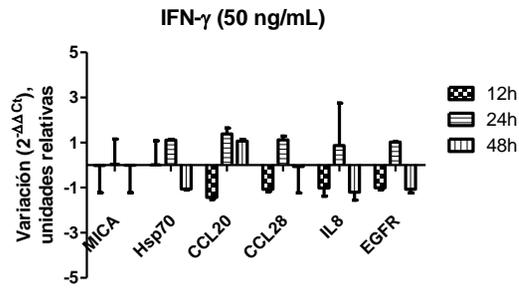
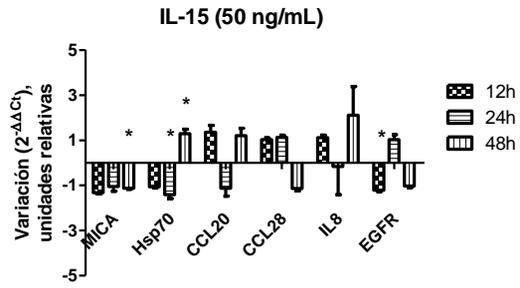


A continuación, se quiso conocer el perfil de expresión de ARNm y de proteína en las células Caco-2 cultivadas con los estímulos anteriores. Para ello, se dejaron crecer durante siete días hasta formar la monocapa en placas de 24 pocillos. Al séptimo día, las células fueron estimuladas con digeridos derivados de BSA, de zeína y de gliadina; con los péptidos p31-49 y p57-89 y con las citocinas IL-15, IL-21 e IFN- γ en las mismas concentraciones que se habían utilizado previamente. También quisimos observar los efectos de estos estímulos al añadirlos conjuntamente con IL-15 (50 ng/mL). Cada ensayo se hizo por triplicado. Una vez estimuladas durante 6, 12, 24 y 48 horas, se conservaron los sobrenadantes a -80 °C y se extrajo el ARN para realizar retrotranscripción y PCR (cada muestra se realizó por duplicado). El gen de referencia fue GADPH; que se relativizó con la expresión media de cada molécula de la condición basal correspondiente (carente de estímulo y realizada en el mismo pase). Los datos fueron analizados con el test no paramétrico de Wilcoxon y tomando como significativo un valor de p menor a 0,05.

En un estudio preliminar, los estímulos realizados con los digeridos con pepsina-tripsina de zeína y gliadina no mostraron grandes cambios en cuanto a la expresión de moléculas quimioatrayentes (CCL20, CCL28, IL-8) ni en moléculas de estrés (MICA, Hsp70) o en la expresión de IL-15 y su receptor respecto al digerido de PT-BSA; el cual se utilizó como molécula control, puesto que se incluye comúnmente en la dieta (fig. S6). La única diferencia relevante se encontró en la expresión de CXCL10, molécula que parece aumentar en una exposición temprana a PT-zeína; mientras que disminuye significativamente tras la exposición a PT-gliadina durante 24 horas (fig. S6).

Por todo ello, en los subsiguientes análisis los estímulos con PT-BSA, PT-zeína y PT-gliadina fueron excluidos. Lo mismo ocurrió con los estímulos a las 6 horas, ya que no había grandes diferencias respecto a los estímulos a las 12 horas (fig.S6 y datos no mostrados).

En el resto de estímulos, se observaron ligeras variaciones en las moléculas de estrés MICA y Hsp70, así como en los factores quimioatrayentes CCL20, CCL28 e IL-8 o en el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) (fig. 29). El estímulo que más alteró la expresión, tanto de moléculas quimioatrayentes como de estrés, fue el péptido p31-49, que provocó el aumento de expresión de ARNm de todas estas moléculas a las 12 horas y de todos, a excepción de CCL28, a las 24 horas (fig. 29). Sin embargo, el estímulo con este mismo péptido, p31-49, junto con IL-15, sólo aumentó significativamente la expresión de CCL20, CCL28 e IL-8; mientras que MICA, Hsp70 y EGFR no mostraron cambios significativos (fig. 29). El otro péptido, p57-89, no provocó diferencias significativas en la expresión de estas moléculas quimioatrayentes, aunque sí unas variaciones moderadas en la expresión de moléculas de estrés o EGFR (fig. 29). Por su parte, las citocinas tuvieron un menor efecto que los péptidos, siendo IL-21 la más relevante ya que aumenta significativamente la expresión de CCL20 a las 48 horas (incremento de 2,33 veces) (fig. 29). La IL-15 provoca una disminución de la expresión de MICA y un aumento de Hsp70 a las 48 horas (fig. 29). Estos efectos son comparables con la expresión de CXCL10 y otros componentes relacionados (CXCR3, CXCL9 y CXCL11), ya que el péptido p31-49 es capaz de aumentar la expresión de todos ellos de forma significativa más que ningún otro estímulo; aunque en presencia de IL-15 se modera (fig. S7). Cabe destacar también que la presencia del péptido p57-89 junto con IL-15 provoca un aumento significativo en la expresión de CXCL10 y CXCL11 a las 24 horas (fig. S7).



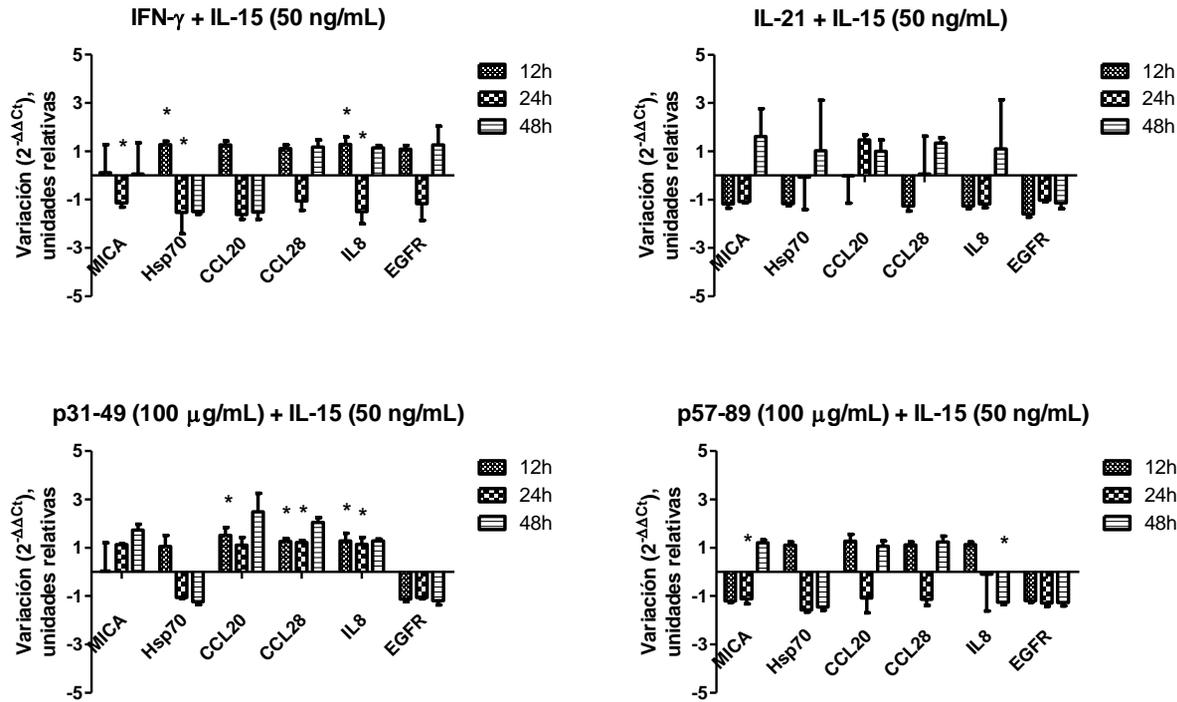
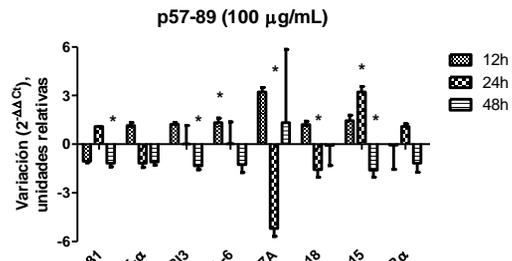
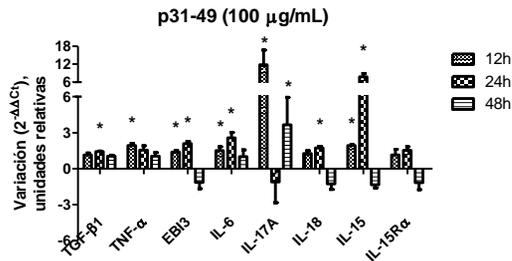
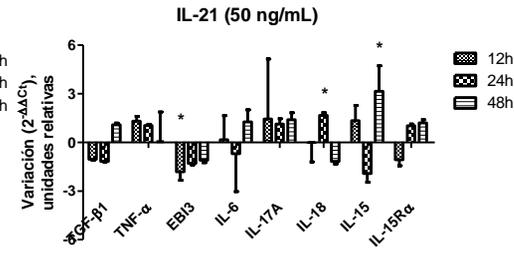
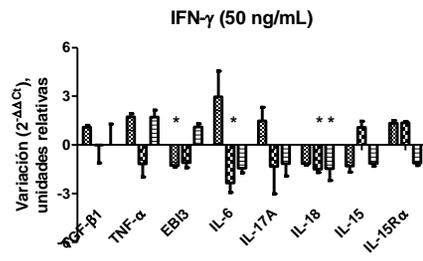
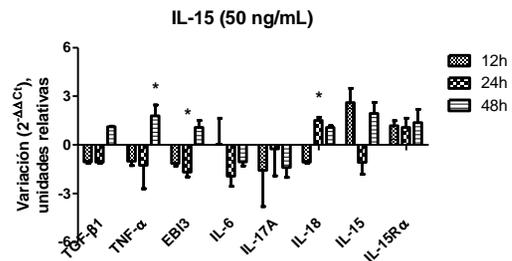


Figura 29: Expresión relativa de moléculas de estrés y de quimiocinas en células Caco-2 estimuladas con citocinas y péptidos de gliadina (p31-49 y p57-89) durante 12, 24 y 48 horas. Se representa la mediana y el rango intercuartil. * $p < 0,05$ en relación al control basal.



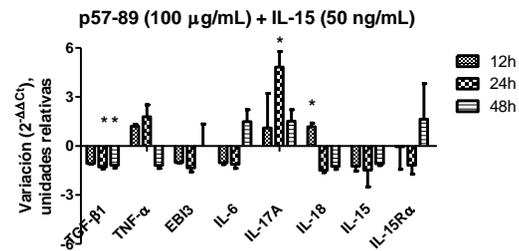
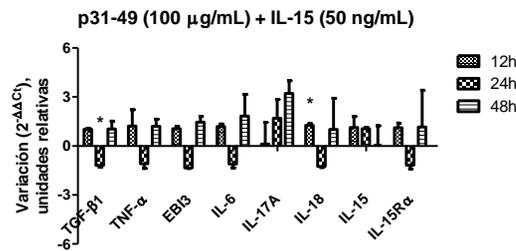
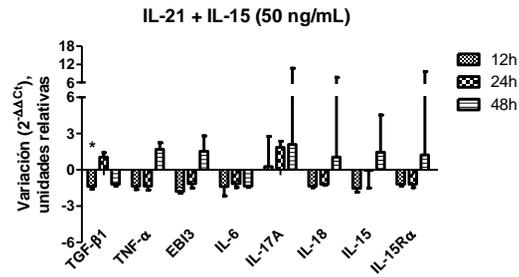
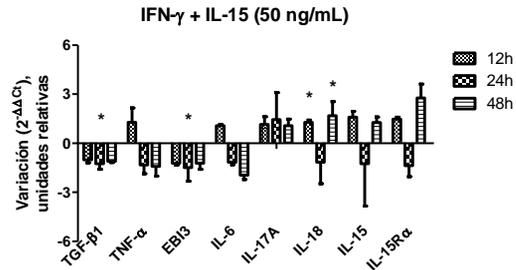


Figura 30: Expresión relativa de citocinas en células Caco-2 estimuladas con citocinas y con péptidos de gliadina (p31-49 y p57-89) durante 12, 24 y 48 horas. Se representa la mediana y el rango intercuartil. * $p < 0,05$ en relación al control basal.

Todas las citocinas de perfil inflamatorio que se decidieron estudiar (TGF- β 1, TNF- α , EBI3, IL-6, IL-17A, IL-18 e IL-15), aumentaron significativamente al estimular con el péptido p31-49 (fig. 30). Cabe destacar los aumentos de 11,82 veces de IL-17A a las 12 horas y de 7,79 veces de IL-15 a las 24 horas. El resto de citocinas se mantuvieron en el rango de 1,38 a 2,57 veces aumentadas y el receptor de IL-15, IL-15R α , no mostró cambios significativos (fig. 30).

En comparación con los resultados anteriores, el péptido p57-89 sólo produjo un ligero aumento en los niveles de ARNm de IL-6 e IL-15 (1,33 y 3,21 veces; respectivamente), mientras que disminuyó la expresión de IL-17A 5,19 veces a las 24 horas (fig. 30). La estimulación con citocinas fue comparable al control basal, mostrando ligeros cambios en la expresión de TNF- α , EBI3, IL-6 e IL-18 (fig. 30). El estímulo con IL-21 fue el único capaz de aumentar significativamente la expresión de IL-15 a un nivel de 3,15 veces tras una exposición de 48 horas (fig. 30). Aunque sí que se hallaron aumentos significativos de IL-15 para las células estimuladas con péptidos o con IL-21, no sucedió así para la expresión de su receptor, IL-15R α (fig. 30). Por otra parte, al añadir IL-15 junto con los diferentes estímulos, los aumentos señalados anteriormente se perdieron (fig. 30). Curiosamente, el estímulo con el péptido p57-89 junto con IL-15 produjo un aumento de IL-17A (4,83 veces) a las 24 horas (fig. 30). También se estudió la expresión de IFN- γ e IL-21, pero sus niveles se encontraron por debajo de los límites de detección.

Por último, se estudiaron los niveles de expresión proteica de CXCL10, IL-17A e IL-15 en los sobrenadantes de cultivo de las células Caco-2 estimuladas mediante ELISA (figs. 31 y 32). Para ello, se realizó un *pool* de las muestras triplicadas. En el ELISA de IL-15 no se incluyeron los sobrenadantes de los estímulos en los que se hubo añadido IL-15 (fig. 31). La cuantificación de CXCL10 no fue posible debido a que sus niveles se encontraban por debajo del límite de detección (datos no mostrados).

Aunque los niveles de expresión de ARNm de IL-15 habían resultado aumentados sólo en los estímulos de IL-21, p31-49 y p57-89; en el ELISA también se detectó IL-15 al estimular con IFN- γ o en el basal; aunque para todos los estímulos los niveles fueron mínimos (fig. 31).

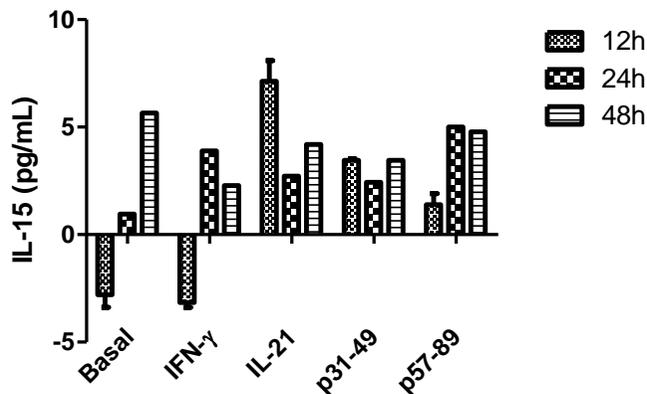


Figura 31: Expresión proteica de IL-15 en sobrenadantes de cultivo de células Caco-2 estimuladas con citocinas y con péptidos de gliadina (p31-49 y p57-89) durante 12, 24 y 48 horas. Se representa la mediana y el rango.

En el caso de la IL-17A, las citocinas y el péptido p57-89 lograron aumentar su expresión, pero no sucedió así con el péptido p31-49 (fig. 32). Además, al añadir IL-15, la detección fue más destacable (50 – 287 pg/mL) y también fue detectable para el estímulo con el péptido p31-49 e IL-15 (105 pg/mL) (fig. 32).

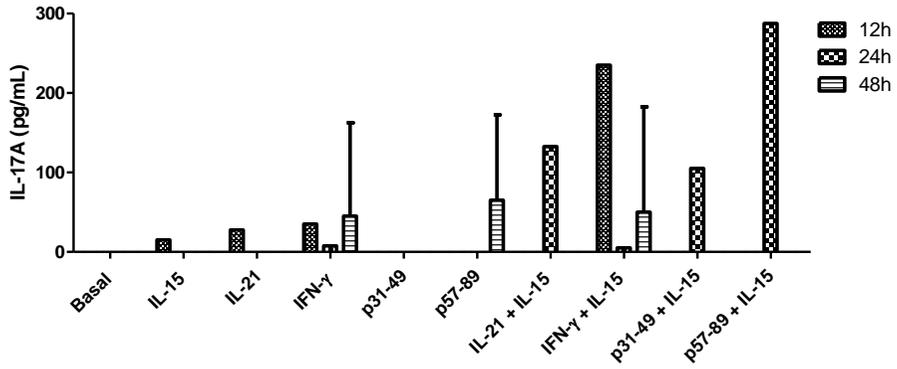


Figura 32: Expresión proteica de IL-17A en sobrenadantes de cultivo de células Caco-2 estimuladas con citocinas y con péptidos de gliadina (p31-49 y p57-89) durante 12, 24 y 48 horas.

VII. Discusión

1. ANÁLISIS DE LOS GENES *IL15* E *IL15RA* EN LA ENFERMEDAD CELIACA

Desde la asociación genética de la región *HLA* con la enfermedad celiaca establecida en 1973²⁵, se han reconocido muchos otros genes gracias a la evolución de las técnicas disponibles: desde el estudio de genes candidato a los estudios GWAS^{31, 32} y al Inmunochip³³. Estos proyectos permitieron identificar la relación de la EC tanto con genes del sistema inmunológico innato como del adaptativo. Del grupo de las citocinas, se han asociado con la enfermedad celiaca los genes *IL1A*, *IL1B*, *IL2*, *IL18* e *IL21*^{31, 198}; sin embargo, la IL-15, que parece tener un papel fundamental en el desarrollo de la EC así como en la comunicación entre los dos tipos de respuestas inmunológicas, nunca se ha encontrado relacionada a nivel genético. No obstante, sí se ha relacionado con otras enfermedades autoinmunes como son la psoriasis^{199, 200}, la diabetes de tipo 1²⁰¹ o la colitis ulcerosa²⁰².

En nuestro estudio, se tuvieron en cuenta los genes *IL15* e *IL15RA*, para los cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los genotipos de dos polimorfismos de la región adyacente a *IL15* en un total de 1544 individuos analizados dentro de la población española, de los cuales un 47,15% eran celíacos (tablas 6 y 7). Estos polimorfismos, rs4956400 y rs11100722, se localizan a 80.405 pb y 20.291 pb en la región 5' aguas arriba de *IL15*, respectivamente; siendo rs4956400 el más cercano al extremo 3' del ARN largo intergénico no codificante *RP11-208N20.1*. A pesar de que estos polimorfismos no se sitúan dentro del gen *IL15*, en esta misma región se han asociado cinco SNPs con la severidad del daño articular en pacientes con artritis reumatoide¹⁶⁵. De esos cinco SNPs identificados por Knevel *et al.*¹⁶⁵, dos de ellos presentan desequilibrio de ligamiento con los SNPs que hemos

asociado con la EC: rs7667746 tiene un coeficiente de correlación r^2 de 0,98 con el SNP rs4956400; y rs7665842, localizado dentro de *RP11-208N20.1*, tiene un valor de r^2 de 0,93 con rs11100722 (tabla 9). Por todo ello, los polimorfismos asociados de ambos estudios podrían situarse en una región reguladora de *IL15* y *RP11-208N20.1* e intervenir no sólo en estas dos enfermedades, sino también en otras enfermedades autoinmunes en las que la IL-15 juegue un papel importante. Por otra parte, un estudio que intentó replicar los resultados de Knevel *et al.*¹⁶⁵ en pacientes japoneses con artritis reumatoide no asoció esos polimorfismos en su población²⁰³; con lo que nuestros resultados deberían ser interpretados con cautela en poblaciones de ascendencia no europea.

Por otra parte, los escasos estudios centrados en *IL15RA* no han relacionado este gen con ninguna enfermedad de carácter autoinmune. Sólo el SNP rs2228059, que provoca una mutación *missense* en la que se sustituye A por C, se ha asociado a un menor riesgo de adenocarcinoma gástrico en la población china²⁰⁴. Por lo tanto, de acuerdo a nuestros resultados, las variaciones en el gen *IL15RA* no parecen tener un papel en la susceptibilidad a padecer la EC.

Sin embargo, es importante destacar que hemos identificado 4 SNPs que parecen diferir entre pacientes EC diagnosticados durante la infancia o en la edad adulta (tabla 10). Se trata de 3 SNPs localizados en regiones intrónicas (rs2296141, rs3136614 y rs3181148) y uno en la región 3'-UTR (rs2229135). Sería interesante comparar estos resultados con poblaciones de pacientes celíacos de origen diferente así como con pacientes con otras enfermedades autoinmunes.

No hay que omitir que algunos de los polimorfismos estudiados, tanto de *IL15* como de *IL15RA*, muestran correlaciones estadísticamente significativas con la expresión del otro gen (tabla 9); por lo que la regulación

de ambos genes podría estar relacionada. Sin embargo, el conocimiento de la regulación génica ha de ampliarse con futuras técnicas y aproximaciones para poder corroborar estos resultados; al igual que es necesario mejorar la identificación de las regiones del genoma en las que no hay genes, así como determinar las funciones de cada ARNlinc.

2. DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES DE *SPLICING* ALTERNATIVO DE IL-15R α EN EL EPITELIO INTESTINAL HUMANO USANDO COMO MODELO LAS CÉLULAS CACO-2

Los efectos de un gen pueden modularse en cada tejido en función de la metilación de las cadenas de ADN, de las modificaciones en las histonas o del nivel de empaquetamiento, entre otros ²⁰⁵. Todas estas modificaciones epigenéticas se relacionan con la expresión de un gen, así como de la presencia de diferentes variantes de *splicing* alternativo ²⁰⁶. Debido a que en muchas ocasiones pueden pasarse por alto los efectos de un gen al estudiar sólo sus variaciones génicas, hemos estudiado las variaciones que podrían darse en el epitelio intestinal por *splicing* alternativo en la expresión de IL-15R α , tomando como modelo de célula epitelial intestinal la línea celular Caco-2.

Para este análisis seguimos el abordaje de Wu *et al.* ²⁰⁷, por el que amplificamos las secuencias descritas de IL-15R α humana tratando de dirigir las a los codones de inicio y de fin de la transcripción (tabla 2). Como resultado, obtuvimos cinco sub-variantes, dos derivadas de las variantes 1 y 2 y el resto de la variante 3. Aunque se consiguió ver su expresión como

proteína, no fue así para la sub-variante más susceptible de poder unir IL-15 (de 498 pb, aislada de la variante 3, fig. 17); sin embargo, se puede concretar que ninguna de estas variantes parece seguir la vía secretora puesto que no co-localizan con el aparato de Golgi y, además, no se detectaron variaciones en el peso molecular predicho que pudieran indicar un proceso de glicosilación (fig. 16 y 17). Puesto que las sub-variantes no muestran una localización diferente del control ni contienen el exón necesario para unir IL-15; su función proteica no está clara (figs. 14 y 17). Sin embargo, se confirma que la variación en la expresión de ARNm de las diferentes sub-variantes de IL-15R α parece estar regulada por metilación del ADN¹⁴⁰; no sólo en las variantes 1 y 2 (y sus derivadas), sino también en las otras variantes presentes en la célula, al menos en el modelo de células valorado (células Caco-2, fig. 18). A pesar de que no se han comparado los niveles totales de expresión de ARNm de IL-15R α con el número de variantes transcritas, éstos pueden ser factores independientes, como demostró el estudio de Diniz *et al.*¹⁴⁰. Sin embargo, al haber realizado una amplificación de los exones 4 a 6, podrían no haberse detectado todas las sub-variantes de IL-15R α , tal como muestran los resultados de esta tesis, donde se han detectado sub-variantes carentes del cuarto exón, aunque éstas son incapaces de unir IL-15 (fig. 14). Por lo tanto, esta asociación debería ser comprobada, no sólo en los diferentes tejidos, sino también en los tipos celulares que los forman.

A pesar de que los estudios de epigenética son recientes, ya se han identificado alteraciones en otras enfermedades autoinmunes^{205, 208}. Sin embargo, los estudios en EC son escasos. Se han identificado varios microARN que se encuentran regulados negativamente en la mucosa intestinal de pacientes con EC, algunos de ellos modulados en presencia de péptidos derivados de gliadina^{209, 210}. Por su parte, los estudios de metilación se han centrado en el adenocarcinoma de intestino delgado relacionado con la EC, en el que se halla una mayor metilación²¹¹. Estudios más genéricos han identificado una alteración de la expresión génica intestinal debido a la

inhibición de la desacetilación de histonas ²¹² y a una mayor metilación del ADN ²¹³. Tampoco habría que olvidar que factores como la dieta ²¹⁴ y el sexo ²¹⁵ pueden alterar la epigenética intestinal, por lo que sería interesante incluir estas variantes en futuras líneas de investigación sobre la EC, puesto que, además de que el único tratamiento es la eliminación del gluten de la dieta, se da más comúnmente en mujeres que en hombres ¹⁵.

3. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE IL-15 E IL-15R α EN EL INTESTINO HUMANO

Para obtener una visión más global de lo que IL-15 e IL-15R α suponen para los pacientes con enfermedad celiaca, estudiamos sendas expresiones de ARNm y de proteína en biopsias de pacientes celiacos. Se analizó también por qPCR la expresión de IFN- γ ²¹⁶ e IL-21 ^{31, 122}, debido a su relación con IL-15 en la EC, y las moléculas de la vía de señalización de IL-15: STAT3, STAT5A y STAT5B ¹⁴⁷.

Con este procedimiento, se detectó un aumento significativo de IFN- γ en pacientes en edad infantil y en pacientes adultos con ECR, pero no en celiacos adultos sin complicaciones e independientemente de la dieta (fig. 20). Nilsen *et al.* ⁵⁸ describieron un aumento de la expresión de ARNm de IFN- γ así como de células IFN- γ + en la LP en pacientes celiacos en actividad, principalmente adultos. De la misma manera, otros autores han tratado de replicar los resultados. Mention *et al.* ²¹⁷ detectaron este aumento de ARNm en pacientes celiacos adultos, tanto en actividad como en tratamiento o con ECR; mientras que Caruso *et al.* ²¹⁸ sólo lo detectaron en pacientes celiacos en actividad. Por otra parte, los estudios por Monteleone *et al.* ²¹⁹ y Mazarella *et al.* ²²⁰ identifican un aumento de ARNm de IFN- γ en pacientes adultos con EC

en actividad; y, en el estudio de Mazarella *et al.*²²⁰ se identifica también mediante *western blot*. En relación con nuestro estudio, el valor de p de los pacientes EC adultos en actividad con los individuos control es cercano a la significación estadística. En cambio, el valor obtenido al comparar este mismo grupo con los niños EC (también en actividad), es de 0,327; es decir, que no son estadísticamente diferentes. Teniendo en cuenta que el grupo de niños sí incrementó los niveles de ARNm de IFN- γ respecto a los grupos control, que los EC adultos en actividad han mostrado una mayor variación que los niños y las evidencias publicadas por otros grupos, la variación de ARNm de IFN- γ en los pacientes EC adultos en actividad valorados, podría considerarse incrementada. Si bien esta variación ha resultado ser más obvia en el grupo infantil.

Por otra parte, tanto Mention *et al.*²¹⁷ como nuestro grupo, ha identificado un aumento de ARNm de IFN- γ en pacientes con ECR (fig. 20). Además, cabe destacar que estos estudios sólo se basan en muestras de pacientes adultos con EC en actividad; mientras que nuestros resultados muestran un aumento de la expresión en pacientes EC en actividad de edad pediátrica (fig. 20).

En cuanto a la expresión de IL-21, encontramos un aumento significativo en pacientes con EC en edad infantil (fig. 20), acorde a los estudios previos realizados en pacientes de la misma edad^{126, 221}. Una tendencia similar se puede observar también en los pacientes con ECR (fig. 20), aunque de forma no significativa. El único estudio hallado en pacientes con ECR es el de Caruso *et al.*²¹⁸, en el que detectaron unos niveles significativamente menores en ECR que en EC en actividad. Por otra parte, nuestros pacientes adultos con EC en actividad no mostraron alteraciones (fig. 20), lo cual contrasta con los datos presentados por Fina *et al.*⁶⁰, ya que sus estudios muestran un aumento de ARNm y de proteína de IL-21 en pacientes adultos con EC en actividad.

Al igual que Mention *et al.*²¹⁷, no fuimos capaces de detectar variaciones en la expresión de ARNm de IL-15 en ninguno de los grupos estudiados (fig. 20); sin embargo, Caruso *et al.*²¹⁸ describieron un aumento significativo del ARNm de esta citocina en pacientes celíacos en tratamiento. Esta diferencia podría deberse a cuestiones técnicas como el diseño de cebadores. Por otra parte, hemos hallado un aumento significativo en la expresión de ARNm de su receptor, IL-15R α , en pacientes adultos con EC en actividad y ECR, siendo mayor en los primeros (fig. 20). Además, este aumento se corrige al seguir una dieta libre de gluten y, curiosamente, no se encuentra en pacientes EC con edad infantil a pesar de que las muestras utilizadas correspondían a pacientes en actividad (fig. 20). Estos datos concuerdan con los publicados anteriormente por nuestro grupo¹²³ y, además, aportan una nueva evidencia en pacientes con ECR.

Los estudios realizados en EC sobre moduladores de transcripción han sido los publicados por Mazzarella *et al.*²²⁰ y Monteleone *et al.*²¹⁹. En el primero de ellos, se estudian STAT1, ya que se activa por medio de IFN- γ ; y SOCS1, que suprime la amplitud de respuesta de STAT1; en el que se halla una mayor activación de STAT1 (fosforilación) en pacientes con EC en actividad que en el grupo control y unos niveles normales de SOCS1. En este estudio, se determina también un aumento de la fosforilación de STAT3 y SOCS3. En el segundo de los estudios, se analizan los factores T-bet/STAT4, relacionados con la producción de citocinas de perfil Th1; y los factores GATA3/STAT6, relacionados con la producción de citocinas de perfil Th2; observando un aumento de la expresión y de la activación de T-bet en pacientes con EC en actividad. Estos resultados están respaldados por los obtenidos por Fina *et al.*⁶⁰, que además demuestran una relación con IL-21. Nosotros hemos identificado un aumento en la expresión de ARNm de STAT3 en pacientes adultos con EC en actividad (fig. 20), que concuerda con el estudio de Mazzarella *et al.*²²⁰ a pesar de que no distinguieron entre celíacos

en edad pediátrica o adulta. También hemos identificado un aumento en la expresión de STAT5A en pacientes con ECR (fig. 20).

Con estos resultados, apoyamos la hipótesis de que la vía de señalización de IL-15 podría estar más activa en pacientes celíacos que muestran una mayor expresión de IL-15R α y STAT3 en pacientes adultos con EC en actividad; lo que se traduce en un descenso del umbral de respuesta a la IL-15¹²³. En concreto, este hecho estaría ocurriendo en pacientes diagnosticados en la edad adulta, ya que no observamos diferencias en pacientes con EC en edad infantil en actividad respecto a los controles (fig. 20). Este hecho, junto con una posible presentación en *cis* de IL-15 de los linfocitos T CD8+ sobre sí mismos²²², podría tener un papel importante a la hora de mantener las vías de señalización correspondientes²²³ y, con ello, la inflamación en el intestino. En relación a la IL-15, habría que considerar también lo que aportan los modelos murinos, puesto que la presentación en *cis* depende de los niveles de IL-15R α en ratones, mientras que no sucede así en humanos²²².

En el año 2000, Maiuri *et al.*²²⁴ describieron un aumento de la expresión de la proteína de IL-15 en pacientes adultos con EC en actividad mediante la observación y recuento por inmunohistoquímica de células que expresaban IL-15 en la LP intestinal, identificándolas como macrófagos o monocitos residentes del intestino.

Más tarde, Mention *et al.*²¹⁷ identificaron que el aumento de expresión de IL-15 se daba tanto en las criptas como en la LP en la mucosa duodenal de pacientes con EC en actividad y con ECR utilizando la misma técnica. Por su parte, los pacientes con EC en DSG contaban con unos niveles de IL-15 más bajos que los pacientes con EC en actividad pero mayores que los controles²¹⁷.

Otros dos estudios por Di Sabatino *et al.*²²⁵ y Caruso *et al.*²¹⁸, verificaron también el aumento de IL-15 en extractos proteicos de biopsias

duodenales obtenidos de pacientes con EC en actividad mediante la técnica de ELISA. Además, Di Sabatino *et al.*²²⁵ confirmaron este aumento por *western blot* de extractos proteicos de células mononucleares de la LP mucosa.

Sin embargo, nosotros no hemos observado variación en los niveles de expresión proteica de IL-15 mediante *western blot*, a excepción de un descenso en los pacientes con EC en DSG (fig. 21). Las discrepancias con los estudios previos podrían deberse a la técnica utilizada, ya que es el único estudio realizado con *western blot* de biopsias duodenales sin separación previa de las diferentes células o capas (capa epitelial y LP). Además, las diferencias entre nuestros resultados y los del Di sabatino *et al.*²²⁵ y Caruso *et al.*²¹⁸, en el que se utilizó el ELISA de biopsias duodenales, podría ser debido al método de extracción de proteínas, ya que nosotros utilizamos el método de Trizol, que es menos eficiente para la obtención de proteínas, aunque es uno de los más utilizados para la obtención de ARN de tejido. De la misma manera, la técnica de ELISA cuantificaría la proteína total y, sin embargo, el *western blot* analiza las proteínas separadas por sus pesos moleculares. A pesar de que en nuestro estudio valoramos la proteína total de IL-15 al sumar las cantidades relativas de las bandas de *western blot*, la única diferencia significativa que obtuvimos fue, de nuevo, el descenso de IL-15 en los pacientes con EC en DSG (fig. 21).

Los estudios mencionados anteriormente valoran sólo pacientes adultos; nosotros, sin embargo, valoramos también pacientes con EC en edad infantil, no obteniendo diferencias significativas en la expresión proteica de IL-15 comparado con los controles ni con otros grupos de EC (fig. 21 y 23). En el estudio de Kokkonen *et al.*²²⁶, se evaluó la densidad relativa de IL-15 por área mediante inhumohistoquímica, observando un aumento significativo de IL-15 en pacientes con EC en edad infantil en actividad, concretamente en las vellosidades intestinales, en las criptas y en la mitad de la LP. Nuestros resultados podrían no concordar con los citados porque en el *western blot* se tienen en cuenta las cantidades totales de IL-15 y, a pesar de la separación por

peso molecular, no necesariamente ha de asociarse con la presencia de IL-15 en una determinada capa celular. Por ello, sería interesante repetir los estudios de expresión con esta diferenciación entre grupos de pacientes con EC comparando los valores de expresión de ARN y de proteína extraídos de la capa epitelial en relación a la LP mucosa de forma independiente.

Por otra parte, los resultados de Kokkonen *et al.* demuestran que la expresión proteica de IL-15 podría ser similar en pacientes con EC en actividad tanto en edad infantil como en edad adulta. Aun así, sería interesante realizar una comparación entre los dos grupos de pacientes puesto que, como se ha indicado anteriormente, los niveles de expresión de ARNm de IL-15R α y STAT3 se encuentran aumentadas en los pacientes adultos con EC en actividad respecto al resto de grupos celíacos así como respecto a los controles y, consecuentemente, podrían encontrarse elevados sus niveles de proteína o, en el caso de STAT3, de su forma activada (fosforilada). Además, nuestro grupo ha demostrado con anterioridad una expresión diferencial de proteína de IL-15R α en individuos sanos en edad pediátrica frente a un grupo de adultos por citometría de flujo de células de sangre periférica ²²⁷. Se detectó una mayor expresión de IL-15R α en células NK, linfocitos B y T CD4+, y una disminución de IL-15R α en linfocitos T CD8+ de niños sanos frente a adultos sanos. Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre individuos sanos y pacientes con EC en edad infantil; aunque sí entre individuos sanos y pacientes adultos con EC, ya que estos últimos mostraron un aumento de IL-15R α en células NK ²²⁷.

En cuanto a la expresión proteica de IL-15R α , Di Sabatino *et al.* ²²⁵ demostraron un aumento en su expresión en los LIEs de pacientes adultos con EC en actividad así como en DSG. Nuestro laboratorio identificó también una expresión mayor de IL-15R α en las células epiteliales, en las criptas y en la LP de pacientes celíacos en actividad por inmunohistoquímica ¹²³. Por otro

lado, mediante *western blot*, identificamos un aumento significativo en la cantidad de IL-15R α en pacientes con ECR respecto a pacientes EC en DSG. El resto de grupos no mostró diferencias significativas (fig. 22). Sin embargo, al evaluar el ratio de la intensidad de las bandas de 56 KDa y 40 KDa, se observa un aumento significativo en la expresión mostrada por los pacientes adultos con EC en actividad respecto a los controles (fig. 23). De nuevo, no se encontraron diferencias significativas en los pacientes con EC en edad infantil (fig. 22 y 23).

Es ampliamente conocido que los pacientes EC en actividad presentan atrofia vellositaria ²⁰. Por lo que no fue sorprendente encontrar una disminución en el número de células epiteliales en pacientes con EC al ser evaluadas por citometría de flujo (fig. 25A). Sin embargo, sólo se encontró significativo estadísticamente en los pacientes con ECR; quizá por la escasa cantidad de los pacientes que se pudieron conseguir. Por otra parte, los pacientes con EC en DSG presentaron unos valores similares a los pacientes con EC en actividad, por lo que quizá podrían haber hecho transgresiones involuntarias de la dieta.

La valoración de la expresión de IL-15 en la superficie de los enterocitos tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas en pacientes con EC. Curiosamente, los pacientes con ECR presentaron unos niveles menores de IL-15 en su superficie (fig. 25B), efecto que podría deberse al escaso número de enterocitos en su mucosa duodenal. Por esta razón, determinamos la proporción de enterocitos que expresaban IL-15 respecto al total de enterocitos (fig. 25C). De esta manera, el nivel de expresión de IL-15 en pacientes con ECR no resultó menor que la expresión en el grupo control, aunque tampoco mayor que en el resto de pacientes con EC, dato que concuerda con los datos de Caruso *et al.* ²¹⁸, en el que realiza un ELISA a partir de extractos proteicos de biopsias duodenales; que, por otra parte, difieren de los resultados de Mention *et al.* ²¹⁷. Los pacientes con EC en

DSG, en cambio, mostraron un aumento significativo en los valores del ratio, reforzando quizá la idea de una posible transgresión involuntaria. Como se ha indicado, no hallamos variación en la cantidad de IL-15 expresada en la superficie de los enterocitos intestinales de pacientes con EC en actividad, que contrasta con el aumento identificado por otros grupos^{217, 225}.

Los resultados de IL-15 cuantificada en muestras de suero de individuos sanos y pacientes con EC muestran concentraciones más bajas en estos últimos en edad adulta, tanto en actividad como en DSG (fig. 26), pero no ocurre en el grupo de pacientes con EC en edad infantil. Kokkonen *et al.*²²⁶ estudiaron muestras de suero de pacientes con EC en edad infantil y tampoco hallaron diferencias significativas en la concentración de IL-15. Por otra parte, nuestros resultados muestran también unos niveles de IL-15 mayores en pacientes con EC en DSG al comparar el grupo infantil con el adulto (fig. 26), por lo que habría que comprobar si se trata de un efecto específico del gluten en niños con EC, ya que este grupo no muestra diferencias estadísticamente significativas con los EC infantiles en actividad (fig. 26). Por otra parte, sería interesante comparar estos resultados utilizando un ELISA capaz de detectar el heterodímero IL-15/IL-15R α , ya que se ha demostrado la existencia de IL-15 en suero es debido a su unión con el receptor²²⁸.

4. EFECTOS DE ESTÍMULOS COMUNES EN LA EC EN UN MODELO *IN VITRO* DE EPITELIO INTESTINAL, CÉLULAS CACO-2

El epitelio intestinal es la primera capa de células expuesta a los diferentes elementos que transcurren por el tracto gastrointestinal así como a la microbiota. Por ello, este epitelio es capaz de interactuar con ellos, de reconocerlos y de generar determinadas moléculas para comunicar a las células del sistema inmunológico que las han de tolerar o que han de generar una respuesta ⁷⁴. Es sabido que el gluten puede alterar este balance, ya que modifica la permeabilidad intestinal ⁸⁸, la expresión génica ⁸⁹ o la proliferación celular ⁷³ del epitelio. Debido a su importancia, decidimos estudiar el efecto de los péptidos p31-49 y p57-89, derivados de la α -gliadina, y de las citocinas IL-15, IL-21 e IFN- γ , sobre nuestro modelo de línea celular de epitelio intestinal Caco-2.

El efecto que observamos al cultivar las células Caco-2 en presencia de PT-gliadina fue un descenso en la velocidad de crecimiento (fig. 27); acorde con los resultados de Vincentini *et al.* ²²⁹, que compararon la variación de permeabilidad en células Caco-2 cultivadas en presencia de trigos modernos y otras dos variedades más antiguas. Estos datos concuerdan también con los estudios de permeabilidad realizados con biopsias de pacientes adultos con EC en actividad ^{230, 231}. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios con los péptidos derivados de gliadina o moléculas que están sobreexpresadas en los pacientes con EC, a excepción del IFN- γ , que reduce la RTE en las células Caco-2 ^{232, 233}.

En nuestro estudio, observamos que el péptido p57-89 tuvo un mayor efecto sobre las células Caco-2 que cualquier otro estímulo; mientras que los resultados obtenidos con el péptido p31-49 no fueron estadísticamente significativos en comparación al control negativo ($p=0,0625$), aunque tampoco diferente al de PT-gliadina ($p=0,8438$); por lo que, con estos niveles de significación, se intuye un efecto más similar a PT-gliadina. En cambio, cuando se utilizó IL-21, aunque los resultados tampoco fueron estadísticamente significativos frente a ninguno de los estímulos control, aportaron un valor de p de $0,0625$ en ambos casos; lo que nos hace pensar que tiene un efecto muy moderado en el crecimiento del epitelio intestinal. Los estímulos con IL-15, IFN- γ y p57-89 resultaron estadísticamente diferentes al control negativo y, p57-89, también respecto a la PT-gliadina. Por ello, concluimos que los péptidos derivados de α -gliadina, p31-49 y p57-89, disminuyen la velocidad de crecimiento, siendo p57-89 el que más influencia tiene. Además, estos resultados sugieren que al aumentar la expresión de IL-15 e IFN- γ en los pacientes con EC en actividad, estas citocinas colaborarían a retardar el crecimiento de nuevos enterocitos y, en consecuencia, a reducir la capacidad de reparación de la capa epitelial.

Se ha demostrado que la gliadina también afecta a las uniones estrechas del epitelio intestinal debido a que se libera ZO-1 en el medio; que se une a la superficie celular, con lo que se pierde la capacidad de unión a la ocludina y se reordena el citoesqueleto, incrementando así la permeabilidad intestinal²³⁴, actuando incluso en muestras duodenales de pacientes con EC en un estadio temprano (antes de la detección de la atrofia vellositaria)²³⁵. Estos efectos se han observado también en las células Caco-2^{96, 234}. Por ello, decidimos estudiar la morfología de las células Caco-2 mediante la detección de ZO-1 en células crecidas hasta alcanzar la monocapa (fig. 28).

Las células Caco-2 muestran normalmente interdigitaciones; mientras que en el control positivo, la PT-gliadina, la membrana tiene una apariencia

estirada y parecen aumentar más su tamaño (fig. 28); lo cual concuerda con los estudios previos realizados en esta línea celular²³⁶⁻²³⁸. Los resultados con el péptido p57-89 mostraron un patrón muy similar al obtenido con PT-gliadina; mientras que el resto de estímulos, entre los que se incluyen las citocinas y el péptido p31-49, muestran un perfil de membrana mixto (fig. 28). Estos resultados confirman los observados al valorar la RTE (fig. 27). Sin embargo, sería interesante verificar también la estructura de los filamentos de actina, especialmente con el estímulo de IL-21; como, por ejemplo, mediante una tinción con faloidina, micotoxina capaz de unirse con gran afinidad a la F-actina⁹⁶. De la misma manera, sería interesante evaluar estos resultados en presencia de acetato de larazotida y *Lactobacillus casei*. El acetato de larazotida es un péptido que inhibe la permeabilidad intestinal^{239, 240} y que, además, se ha demostrado que es efectivo *in vivo* en ratones transgénicos HLA-DQ2/DQ8 sensibilizados con gluten²³⁹. Al igual, *L. casei* es capaz de bloquear la permeabilidad intestinal causada por IFN- γ ²⁴¹. Otros compuestos que también tienen el mismo efecto y podrían ser interesantes son la oligomicina²⁴², un antibiótico producido naturalmente por *Streptomyces*; la berberina²⁴³, un alcaloide que se puede extraer de varios tipos de plantas; o el péptido 10-mer²⁴⁴, derivado del trigo durum que tiene propiedades inhibidoras.

A continuación, estudiamos la expresión de diferentes marcadores de estrés celular, de quimioatracción y de inflamación en la línea celular Caco-2.

El único trabajo que describe la alteración de la expresión génica en el epitelio intestinal es el publicado por Bracken *et al.*⁸⁹ en 2008, en el que se purifican enterocitos a partir de biopsias intestinales de pacientes con EC y pacientes control. En él, mediante una técnica de microarray, los autores detectan variaciones de expresión en genes de transporte de proteínas, del ciclo celular y de estructura, entre otros. En esta tesis, el interés se centra en las moléculas de estrés (MICA, Hsp70), de quimioatracción (CCL20, CCL28, IL-8, CXCL10 y moléculas relacionadas con CXCL10), de proliferación

(EGFR) y de inflamación (IFN- γ , TGF- β 1, TNF- α , EBI3, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-15 e IL-15R α).

Como se ha indicado previamente, MICA es una molécula que se expresa en la membrana de las CEI en respuesta a condiciones de estrés y que, en el contexto de la EC, es el ligando de los receptores NKG2D presentes en los LIE de perfil citotóxico que provocan la atrofia vellositaria ¹⁰⁹. Por su parte, Hsp70 es una molécula que facilita el correcto plegamiento de otras proteínas de la célula, fundamental en situaciones de estrés térmico y oxidativo, por lo que es interesante evaluar su expresión al exponer a las células Caco-2 a diferentes estímulos que, como se ha demostrado, alteran su crecimiento y morfología (fig. 27 y 28).

Encontramos interesante valorar también los niveles de ARNm de moléculas quimioatrayentes de linfocitos (CCL20), de linfocitos T (CCL28, IL-8, CXCL10), de neutrófilos (IL-8), de basófilos (IL-8), de monocitos (CCL20, CXCL10) o de DC inmaduras (CCL20). Además, ya se ha descrito un aumento en los niveles de CCL20, CCL28 e IL-8 en algunas enfermedades de carácter autoinmune e inflamatorio como son la enfermedad inflamatoria intestinal ²⁴⁵ o la artritis reumatoide ²⁴⁶. Por otra parte, CXCL10, cuyo inductor es IFN- γ , se encuentra elevada en tejido de pacientes con artritis reumatoide ²⁴⁶ y en suero y tejido de pacientes con EC ⁹⁴. En los pacientes con EC, no sólo se ha detectado un aumento de los niveles de ARNm y proteína de CXCL10, sino que también de otras moléculas relacionadas con ella: su receptor, CXCR3, y otro quimioatrayente de linfocitos que se une a CXCR3, CXCL11 ⁹⁴. Es debido a estos datos que nosotros quisimos analizar también CXCR3, CXCL9 y CXCL11.

EGFR también llamó nuestro interés debido a la alteración constitutiva de su expresión en pacientes con EC ⁷³, como se indicó en la introducción.

En cuanto a las citocinas, IFN- γ e IL-21 se seleccionaron debido a su relación con IL-15 y la EC, además de su carácter proinflamatorio, así como

TNF- α , IL-6 e IL-18^{59, 247, 248}. IL-17A fue seleccionada por su relación con la IL-21, ya que estas dos citocinas pueden ser producidas por los linfocitos Th17¹⁵⁸. Por otra parte, EBI3, subunidad de IL-27, es capaz de señalar en los linfocitos T CD4+ vía Jak/STAT (especialmente STAT3), misma vía que utiliza IL-15²⁴⁹. Por último, se decidió estudiar TGF- β 1 por su capacidad de favorecer el desarrollo de células Treg o, junto con IL-6 e IL-21, de favorecer el desarrollo de células Th17²⁵⁰; además de que IL-15 interfiere con la señalización de TGF- β 1 en las células Treg¹²⁷.

En un análisis preliminar en el que se compararon los niveles de expresión tras estimular con PT-BSA (control), PT-zeína (cereal sin prolaminas) y PT-gliadina (prolamina de trigo); no se encontraron diferencias con el grupo control en relación a las moléculas MICA, Hsp70, CCL20, CCL28, IL-8, IL-15 e IL-15R α (fig. S6). La única diferencia fue el aumento de la expresión de CXCL10 tras una exposición temprana a PT-zeína y una disminución de la expresión tras el estímulo con PT-gliadina a las 24 horas (fig. S6). En cambio, en biopsias de pacientes con EC en actividad se han hallado aumentos de la expresión de ARNm y de proteína de CXCL10 en el epitelio y en la LP de la mucosa duodenal⁹⁴. Sin embargo, el ARNm que se analizó en el estudio de Bondar *et al.*⁹⁴ fue obtenido de biopsias, mientras que aquí sólo se ha tenido en cuenta el epitelio intestinal, aunque con el estímulo de p31-49 sí se observaron diferencias (ver más adelante).

También hay estudios que indican un aumento de la expresión de MICA en biopsias de pacientes con EC en actividad⁹⁵ y de pacientes con EC en DSG con exposición a gluten *in vitro*¹¹⁹. En cuanto a la molécula Hsp70, no se han descrito variaciones de expresión tras una provocación con gluten *in vivo* en pacientes con EC en DSG²⁵¹. El único de estos datos que concuerda con nuestros resultados es la expresión de Hsp70 (fig. S6) pero, de nuevo, en este trabajo es la primera vez que se tiene en cuenta únicamente el epitelio. Por otra parte, no encontramos variación en la expresión de IL-15, que concuerda con nuestros resultados de expresión en biopsias (figs. 20 y S6); ni

de IL-15R α , que, sin embargo, sí encontramos un aumento de sus niveles de ARNm en biopsias de pacientes adultos con EC en actividad y con ECR (figs. 20 y S6).

Como ya se ha indicado, estudios realizados con muestras de biopsia intestinal, muestran un aumento de la expresión de MICA^{95, 119} y ninguna variación en Hsp70²⁵¹. En las células Caco-2 observamos una disminución de MICA al estimular con IL-15, p57-89 (sólo a las 48h) y los estímulos conjuntos de IFN- γ con IL-15 y del péptido p57-89 con IL-15. En el resto de los estímulos, la expresión de MICA no se vio alterada (fig. 29). En cambio, sí observamos un incremento en la expresión de Hsp70 al estimular con IL-15 (48 horas) y con IFN- γ junto con IL-15 (12 horas). Además, los péptidos de gliadina aumentaron la expresión de Hsp70 hasta las 48 horas y, después, disminuyó (fig. 29). Estos efectos podrían deberse a que sólo se está valorando un estímulo concreto, ya que al exponer a la vez un péptido e IL-15, no se observan variaciones. Además, puede que la cantidad de péptidos que hemos utilizado no concuerde con la cantidad que pueda haber en biopsias extraídas tras una provocación con gluten *in vivo*; si bien 100 $\mu\text{g/mL}$ es una concentración ampliamente utilizada para estudios con péptidos *in vitro*.

En cuanto a las moléculas quimioatrayentes, no hay estudios con CCL20 y CCL28 en biopsias de pacientes con EC. Aquí mostramos que IL-21 induce un aumento de expresión de CCL28 y CCL20 tras 24 y 48 horas, respectivamente; efecto que se pierde si el medio contiene también IL-15 (fig. 29). Al comparar la expresión de estos dos quimioatrayentes tras la estimulación con los péptidos p31-49 y p57-89, el primero aumenta su expresión principalmente a las 12-24 horas, mientras que p57-89 no es capaz de variar la expresión de ninguno de ellos. Además, el efecto de p31-49 se mantiene aun cuando se incluye a la vez IL-15 (fig. 29).

Por otra parte, se ha demostrado que los niveles de expresión de ARNm de IL-8 aumentan en biopsias duodenales de pacientes con EC tras una prueba de provocación con gluten *in vivo*²⁵¹, y otros estudios corroboran una mayor concentración de IL-8 en suero de pacientes con EC en actividad²⁵²⁻²⁵⁶. En las células Caco-2, se puede observar que este aumento se debe al péptido p31-49 (12-24 horas) o con una exposición temprana a IFN- γ e IL-15 (12 horas), ya que después disminuye (24 horas); al igual que ocurre cuando utilizamos p57-89 e IL-15 tras 48 horas (fig. 29).

La expresión del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), sólo aumenta tras el estímulo con p31-49 (12-24 horas) y, levemente, por p57-89 (12 horas) (fig. 29). La vía de señalización y la expresión de EGFR se encuentran alteradas en los enterocitos de las criptas de pacientes con EC de forma independiente a la dieta⁷³; por lo que, esta observación en la línea celular podría indicar que el aumento de expresión de EGFR sería mucho mayor en el epitelio intestinal de los pacientes con EC tras una exposición al gluten.

Por otra parte, los niveles de expresión de las moléculas relacionadas con CXCL10 (incluyendo CXCR3, CXCL9 y CXCL11), se incrementan tras el estímulo con el péptido p31-49 en los distintos tiempos utilizados, siendo más destacable en una exposición temprana de 12 horas (fig. S7); que, como ya se indicó, se encontraron elevados en biopsias de pacientes con EC en actividad⁹⁴. La diferencia con el estudio de Bondar *et al.*⁹⁴ es que nosotros sí que hemos hallado un aumento significativo de CXCL9 a las 12 y 48 horas sobre las células Caco-2. Además, es interesante que la expresión de CXCL10 siga aumentada en presencia del péptido p31-49 y de IL-15 y que aumenta en presencia de p57-89 e IL-15. En este último caso, se observa también un aumento de CXCL11 a las 24 horas (fig. S7). Por consiguiente, los resultados indican que el comportamiento de las células frente a estímulos aislados y a estímulos con dos compuestos es complejo y, por tanto, si se tienen en cuenta

los estímulos conjuntos de p31-49 con IL-15 y de p57-89 con IL-15, estaríamos observando posiblemente un aumento de los niveles de ARNm de CXCL10 y CXCL11, lo cual concordaría con los datos de Bondar *et al.*⁹⁴

Por otra parte, utilizando la línea celular HT-29, se ha demostrado que IFN- γ estimula la expresión de ARNm y de proteína de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en el epitelio intestinal²⁵⁷, lo que no es corroborado por nuestros resultados. Esto podría deberse a que las células HT-29 y Caco-2, a pesar de que ambas son líneas celulares de adenocarcinoma humano, responden de manera diferente, pudiendo ser HT-29 mejores respondedoras que Caco-2 a determinados estímulos²⁵⁸.

Como sucede con otras moléculas, TGF- β 1 aumentó sólo en las células Caco-2 estimuladas con p31-49 (fig. 30). En cambio, su expresión disminuyó con el péptido p57-89 y con los estímulos en los que estaba presente IL-15 (fig. 30). En un estudio publicado por Lionetti *et al.*²⁵⁹, se demuestra que la expresión de TGF- β en pacientes con EC aparece escasamente y de forma parcheada a lo largo del epitelio y con menor intensidad que en muestras de individuos control.

TNF- α , cuya expresión aumentó significativamente con el estímulo de IL-15 (48 horas) y con el péptido p31-49 (12 horas), no muestra variaciones cuando se hace el estímulo conjunto (fig. 30). Esta observación no es extraña, ya que nuestro grupo demostró que no había variación en el ARNm de biopsias de pacientes con EC en actividad²⁶⁰, muestras con mayor complejidad que las que hemos realizado utilizando sólo un tipo celular. Por otra parte, se ha demostrado que las células Caco-2 expresan TNF- α en presencia de PT-gliadina²⁶¹, lo cual podría ser causado por p31-49 o péptidos similares. Otros estudios con biopsias también demuestran la escasa presencia de ARNm de TNF- α en el epitelio^{94, 248}; aunque parece que sí hay un aumento de proteína en los pacientes con EC al analizar sus biopsias²⁶², suero²⁵⁴ o tras una prueba de provocación con gluten *in vitro* utilizando biopsias²⁶³.

EBI3, un precursor de IL-27, se encuentra disminuido en general, excepto tras utilizar el estímulo de p31-49 (fig. 30). Sin embargo, esta molécula no ha sido estudiada en el caso de la EC. En cambio, los niveles de ARNm de IL-6 y de IL-17A, se sobreexpresan al estimular con p31-49, aunque se pierde al añadir IL-15. Curiosamente, la expresión de IL-6 también aumenta con p57-89 y la de IL-17A con p57-89 e IL-15 (fig. 30). Los estudios realizados con IL-6 demuestran el aumento de la expresión de ARNm en biopsias de pacientes con EC en DSG estimuladas con el péptido p31-49 *in vitro*²⁶⁴, también en biopsias de pacientes con EC en actividad²⁶², así como en células de la capa leucoplaquetaria de EC^{263,265} y en muestras de suero de estos pacientes²⁵⁴. Los estudios con IL-17A confirman nuestros resultados ya que se ha hallado un aumento de su expresión tanto a nivel de ARNm²⁶⁶⁻²⁶⁸, como de proteína en tejido²⁶⁸ y en suero²⁵⁵.

En estudios anteriores, nuestro grupo demostró que la IL-18 estaba aumentada en las muestras de pacientes con EC²⁶⁰; ahora, vemos que, individualmente, estos resultados pueden ser un efecto de IL-15, IL-21 o p31-49; ya que con los estímulos con IFN- γ y el péptido p57-89 se observa que la expresión de esta citocina está disminuida. En los estímulos en presencia de otra citocina o de un péptido junto con IL-15, la expresión de IL-18 aumentó principalmente a las 12 horas, excepto cuando se utilizaron IL-21 o el péptido p57-89 junto a IL-15 (fig. 30). La expresión de la proteína IL-18 se observa en las criptas epiteliales²⁶⁰ y en células de la capa leucoplaquetaria tras la provocación con gluten *in vitro*²⁶⁹.

Por último, hemos podido observar que las células Caco-2 expresan mayores niveles de ARNm de IL-15 al ser estimuladas con IL-21 o con los péptidos de gliadina; sin embargo, se pierde cuando los estímulos se hacen de forma simultánea (fig. 30). No se observan variaciones en los niveles de expresión de ARNm de IL-15R α (fig. 30). Anteriormente, se había indicado

que no había cambios en la expresión de ARNm de IL-15 en biopsias de pacientes con EC en actividad (fig. 20), tal como había publicado antes Mention *et al.*²¹⁷. Sin embargo, al igual que ocurría con la expresión de TNF- α , el aumento de expresión ante un estímulo simple se pierde al realizar estímulos más complejos (citocinas junto con IL-15 o péptidos junto con IL-15), con lo que, el mismo efecto es observado en las biopsias intestinales, además de que en éstas no se evalúa únicamente la expresión en el epitelio.

Finalmente, quisimos valorar la expresión proteica de CXCL10, IL-15 e IL-17A en los sobrenadantes de cultivo de las células Caco-2 que fueron estimuladas. En estas condiciones, no se pudo detectar CXCL10, mientras que sí se detectó IL-15 en todas las muestras con unos niveles similares al basal, tanto a las 24 como a las 48 horas, y en torno a los límites de detección del kit de ELISA utilizado (fig. 31). En cuanto a la IL-17A, sus niveles fueron muy variables, estando más expresada tras los estímulos en los que IL-15 estaba presente con otras citocinas o con los péptidos; aunque no se detectó IL-17A a en ninguno de los estímulos a las 24 horas. Estos resultados nos hacen pensar que las diferencias de detección del ELISA entre los diferentes tiempos de un mismo estímulo pueda ser debidas a una posible degradación de las citocinas, a que estén muy diluidas en el medio de cultivo (las células fueron mantenidas durante 12, 24 o 48 horas con 1 mL de medio de cultivo en placas de 24 pocillos) o a que se hayan mezclado los sobrenadantes de los triplicados de cada experimento, pese a haber sido realizados con células del mismo pase. Por tanto, estos resultados no deberían tenerse en cuenta para evaluar la expresión en las células Caco-2.

Al englobar los resultados de la RTE, la distribución de ZO-1 y la expresión de diferentes moléculas, se puede decir que el péptido p31-49 impide el crecimiento celular y la formación de uniones estrechas en las células Caco-2 de forma moderada. Además, es capaz de estresar a las células Caco-2, ya que provoca una sobreexpresión de MICA y Hsp70, y es capaz de

generar una respuesta de tipo inmunológico con el fin de atraer y estimular linfocitos, neutrófilos, basófilos, monocitos y DC hacia la capa epitelial – atracción mediada por CCL20, CCL28, IL-8, CXCL9-11 y estimulación mediada por TGF- β 1, TNF- α , EBI3, IL-6, IL-17A, IL-18 e IL-15. Con este perfil de citocinas, el epitelio podría colaborar en la generación de respuestas de tipo Th1 y de tipo Th17, así como en la reprogramación de los LIE. Por otra parte, el péptido p57-89 retrasa el crecimiento celular y provoca una mayor permeabilización; aunque no colabora en la atracción de células del sistema inmunológico a la capa epitelial. Sin embargo, sí influye en la síntesis de IL-15. Con esto, se reafirma el papel del péptido p31-49 sobre la respuesta inmunológica innata y se establece que el péptido p57-89 altera la morfología y disminuye la velocidad de crecimiento del epitelio intestinal de forma similar a cómo lo hace la gliadina.

De la misma manera, IL-15 e IFN- γ retrasan el crecimiento celular e impiden la formación de uniones estrechas; efectos que son discretos con IL-21. Sin embargo, ninguna de estas citocinas altera demasiado el patrón de expresión molecular de las células Caco-2: IL-21 es la única molécula que podría generar cierta atracción de linfocitos, monocitos y DC mediante CCL20 y CCL28. Tampoco generan un patrón determinado de expresión de citocinas, aunque sí colaboran en la generación de un ambiente proinflamatorio: IL-15 aumenta la expresión de TNF- α e IL-18, mientras que IL-21 parece estimular la expresión de IL-15 e IL-18.

En cambio, en un ambiente en el que se encuentra un péptido e IL-15, la expresión de quimioatrayentes y citocinas se moderan. A pesar de ello, p31-49 e IL-15 consiguen aumentar la expresión de CCL20, CCL28, IL-8 y CXCL10, con lo que linfocitos, neutrófilos, basófilos, monocitos y DC serían igualmente atraídos. Por otra parte, la expresión de citocinas disminuye considerablemente, pudiendo ser que p31-49 e IL-15 compartan algún componente de sus vías de señalización, por lo que se limite la expresión de

citocinas, en particular de IL-15 e IL-17A. En el caso de IL-15, la presencia de IL-15 exógena podría estar inhibiendo la síntesis *de novo* de IL-15. Por último, cabe destacar el aumento de IL-17A al estimular con p57-89 e IL-15; con lo que no se puede descartar tampoco un efecto de p57-89 sobre la respuesta inmunológica innata del epitelio intestinal.

En conjunto, en los pacientes con EC, el péptido p57-89 podría generar una permeabilización primaria en el epitelio, dando paso así a una mayor cantidad de péptidos susceptibles de ser modificados por la TG2 y, en consecuencia, aumentar la presentación antigénica a los linfocitos T CD4+ de la LP mucosa. A su vez, el péptido p31-49 generaría estrés en las células epiteliales, que atraerían y estimularían a diversas células del sistema inmunológico, entre los que se incluirían los LIE. A continuación, ya se habría establecido un perfil proinflamatorio en la mucosa intestinal, por lo que la aparición de IL-15 y un menor umbral de activación de su vía de señalización, generarían rápidamente la reprogramación de los LIE que, finalmente, destruirían el epitelio intestinal. Si la ingesta de gluten se mantiene, nuevos péptidos podrían continuar aumentando la permeabilidad intestinal y evitando la formación de uniones estrechas eficaces; además, generarían un retardo en el crecimiento y reemplazo de CEI, con lo que la atrofia vellositaria se incrementaría.

Con estos resultados, se confirma la utilidad de la línea celular Caco-2 como modelo de célula del epitelio intestinal para el estudio de la enfermedad celiaca, ya que los parámetros de crecimiento y permeabilidad concuerdan con los estudios realizados con muestras procedentes del duodeno de los pacientes con EC. Por otra parte, los estudios de expresión sirven para valorar el efecto de cada una de las moléculas de forma independiente; sin embargo, al añadir estímulos conjuntamente, no todas las alteraciones valoradas concuerdan con lo que se conoce a partir de muestras de pacientes con EC. Los estímulos que han resultado ser más similares han sido los realizados a las

24 horas con los péptidos de gliadina junto con IL-15; a pesar de que no se observa un aumento de MICA, ni se observa un aumento significativo de IL-6 o IL-17A (sólo cierta tendencia al aumento de su expresión de manera no significativa). Esta descoordinación de respuestas podría deberse a que en esta tesis sólo se evalúa el epitelio intestinal, mientras que, normalmente, se analizan muestras de biopsias duodenales, que son mucho más complejas. Sin embargo, sería interesante corroborar lo que sucede por separado en el epitelio y en la LP de la mucosa de los pacientes con EC. Para ello, sería conveniente comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos en otras líneas celulares como HT-29, ya que parece que son mejores respondedoras que las células Caco-2; o con células epiteliales aisladas de biopsias intestinales. De la misma manera, sería interesante desarrollar un modelo de co-cultivo complejo a partir de tejido intestinal, utilizando por un lado células de la capa epitelial (enterocitos y LIEs) y, por otro, células de la LP (células dendríticas, linfocitos T y B específicos de gluten y linfocitos B específicos de TG2) para poder estudiar tanto la EC como otras patologías intestinales.

*VII. Conclusions /
Conclusiones*

Conclusions

According to the results obtained, the conclusions of this work are the following:

- I.** *IL15* gene could be associated to celiac disease by SNPs rs4956400 and rs11100722, located upstream of the 3' end of *IL15*.
- II.** Four SNPs of *IL15RA* gene have been associated in a different way in celiac patients who develop the disease during the childhood or during the adulthood.
- III.** Alternative splicing sub-variants of *IL-15R α* mRNA have been identified which are unable to bind IL-15 or unable to follow the secretory pathway, and whose function is unknown. These sub-variants are regulated through DNA methylation.
- IV.** The IL-15 signaling pathway could be more active in celiac patients, specifically in adult individuals in activity, as *IL-15R α* and *STAT3* mRNA are increased. This would result in a lower IL-15 response threshold.
- V.** IL-15 and IFN- γ cytokines and p31-49 and p57-89 peptides from α -gliadin prevent the normal growth rate in cultured Caco-2 cells similarly to PT-gliadin. Specifically, p57-89 peptide has a greater effect than the other stimuli.

- VI.** IL-15 and IFN- γ cytokines as well as p31-49 and p57-89 peptides are able to modify the Caco-2 tight-junctions in culture. Moreover, p57-89 peptide induces a ZO-1 expression pattern which is very similar to the one produced by PT-gliadin.

- VII.** P31-49 peptide has a direct effect on the intestinal epithelium as it changes the mRNA expression of stress molecules, chemokines and cytokines of Caco-2 cells. IL-15 moderates these effects.

- VIII.** Culture of Caco-2 cells is an useful model to value the effects of different molecules in the intestinal epithelium of celiac patients.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos, las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- I. El gen *IL15* puede estar asociado con la enfermedad celiaca por medio de los SNPs rs4956400 y rs11100722, localizados en el extremo 3' aguas arriba de *IL15*.
- II. Se han identificado cuatro SNPs del gen *IL15RA* que se encuentran asociados de manera diferente en pacientes que desarrollan la EC durante la edad pediátrica o en la edad adulta.
- III. Se han identificado sub-variantes de *splicing* alternativo derivadas del ARNm de *IL-15R α* incapaces de unir *IL-15* o de seguir la vía secretora y cuya función es desconocida. Estas sub-variantes se regulan por metilación del ADN.
- IV. La vía de señalización de *IL-15* se encuentra más activa en pacientes con EC respecto a individuos control, en concreto en pacientes adultos en actividad, ya que muestran una mayor expresión de ARNm de *IL-15R α* y de *STAT3*; lo cual resultaría en una disminución del umbral de respuesta a *IL-15*.
- V. Las citocinas *IL-15* e *IFN- γ* y los péptidos p31-49 y p57-89 derivados de la α -gliadina impiden el crecimiento de las células Caco-2 de forma similar a la PT-gliadina. En concreto, el péptido p57-89, tiene un efecto mayor que otros estímulos.

- VI.** Tanto IL-15, IFN- γ , como los péptidos p31-49 y p57-89 son capaces de alterar las uniones estrechas entre las células Caco-2 en cultivo. Además, el péptido p57-89 induce un patrón de expresión de ZO-1 muy similar al que genera PT-gliadina.

- VII.** El péptido p31-49 tiene un efecto directo sobre el epitelio intestinal, ya que altera la expresión de ARNm de moléculas de estrés, de quimiocinas y de citocinas en las células Caco-2. Estos efectos se moderan en presencia de IL-15.

- VIII.** El cultivo de las células Caco-2 es un modelo útil para valorar los efectos de diferentes moléculas en el epitelio intestinal de los pacientes con EC.

IX. Anexo

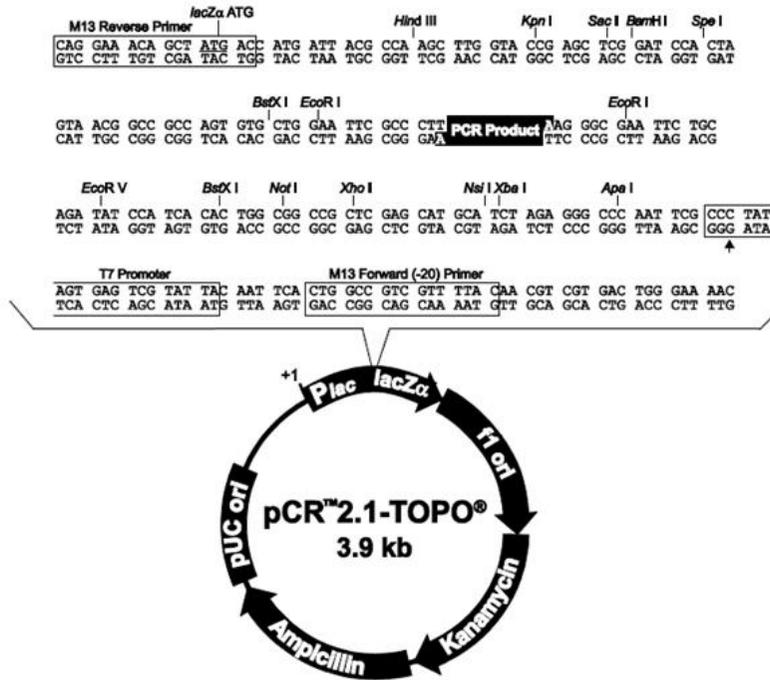


Figura S1: Mapa del vector pCR™2.1-TOPO®. En detalle se muestra el sitio de clonación múltiple.

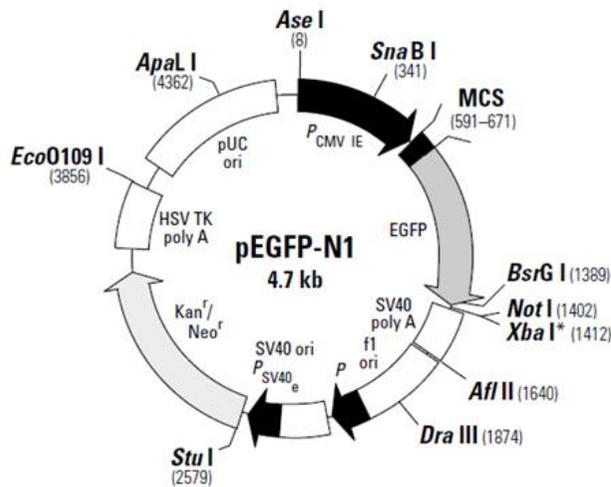


Figura S2: Mapa del vector pEGFP-N1. En detalle se muestra el sitio de clonación múltiple (MCS) localizado entre el promotor de citomegalovirus (P_{CMV}) y la secuencia de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP).

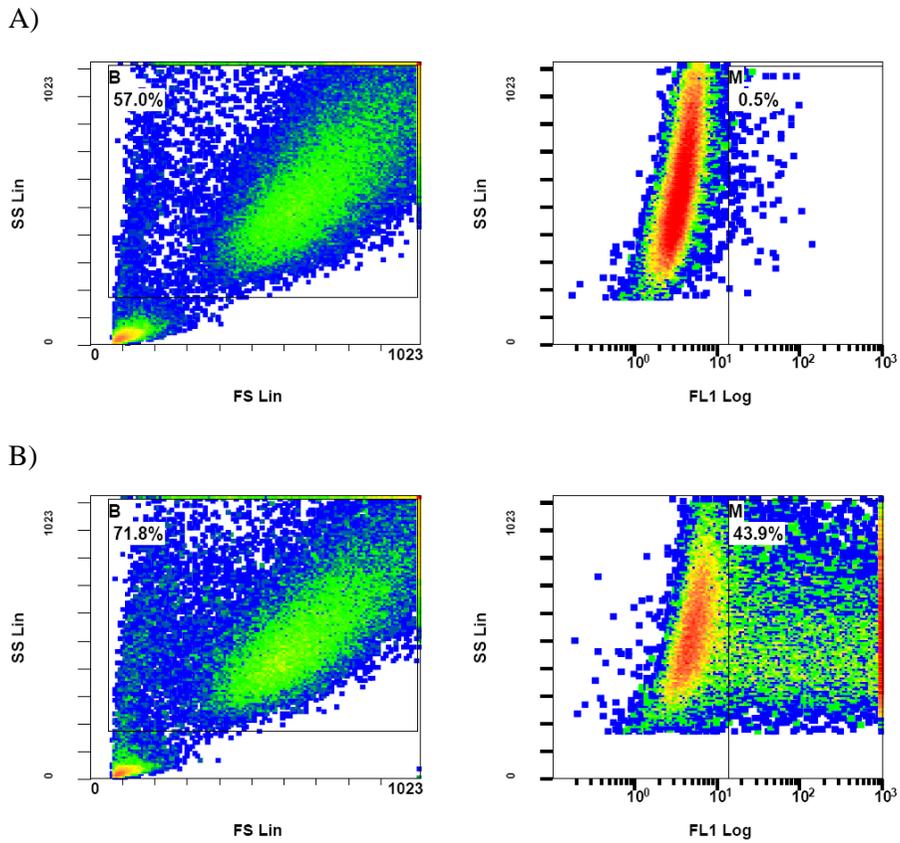


Figura S3: Eficiencia de transfección del plásmido pEGFP-N1 en la línea celular Caco-2 al utilizar *Lipofectamine LTX and Plus Reagent* de Life Technologies (Thermo Scientific); analizado por citometría de flujo. A, células Caco-2 sin transfectar; B, células Caco-2 transfectadas con pEGFP-N1. Los paneles de la izquierda corresponden a la detección de las células Caco-2 por tamaño (FS) y complejidad (SS); los paneles de la derecha corresponden con la detección de la fluorescencia de EGFP (canal FL1).

GENOTIPOS												ALELOS			PORTADORES		
Cr	Gen	SNP	Alelos ¹	Grupos	Parámetro	p	Parámetro	p	Alelo	Parámetro	p						
4	IL15	rs4956400 #	C:T	CC-TT	B56KDa IL15*	0,0381	ARNm IL15*	0,0341	C	B56KDa IL15*	0,0103						
				CT-TT	B56KDa IL15*	0,0317	B56KDa IL15*	0,0310	C	IL15 Total*	0,0264						
4	IL15	rs4371699	A:C				ARNm IL15*	0,0124									
4	IL15	rs11930959	A:G	AA-AG	IL15 Libre	0,0455											
4	IL15	rs11100722 #	C:G				ARNm IL15*	0,0198	C	ARNm IL15*	0,0381						
4	IL15	rs1519551	A:G	GT-TT	B40KDa IL15R α	0,0411			A	B40KDa IL15R α	0,0496						
				GT-TT	IL15R α total	0,0411											
4	IL15	rs9994828	A:G	AG-GG	ARNm IL15R α *	0,0490			A	ARNm IL15R α *	0,0490						
4	IL15	rs10033884	C:T						T	ARNm IL15*	0,0190						
4	IL15	rs996254	A:G	AG-GG	B40KDa IL15R α	0,0411			A	B40KDa IL15R α *	0,0496						
				AG-GG	IL15R α total	0,0411											
4	IL15	rs7663689	C:T	CC-CT	B40KDa IL15*	0,0396	B40KDa IL15*	0,0350	T	B40KDa IL15*	0,0275						
4	IL15	rs1389098	C:T				B40KDa IL15*	0,0076	C	B40KDa IL15*	0,0297						
							B40KDa IL15R α *	0,0179	C	IL15 Total*	0,0418						
							IL15R α Total*	0,0362									
4	IL15	rs17701271	A:C				B56KDa IL15*	0,0323									
							B40KDa IL15*	0,0323									
10	IL15RA	rs8177636	A:G						A	Ratio IL15*	0,0380						
10	IL15RA	rs3736863	A:T	AT-TT	B40KDa IL15*	0,0225	B40KDa IL15*	0,0453	A	B40KDa IL15*	0,0225						
				AT-TT	Ratio IL15*	0,0075	Ratio IL15*	0,0200	A	Ratio IL15*	0,0075						
				AT-TT	Ratio IL15R α *	0,0360			A	Ratio IL15R α *	0,0360						
10	IL15RA	rs8177667	A:C	AA-CC	IL15 Libre*	0,0256			A	IL15 Libre*	0,0337						

				AA-CC	B40KDa IL15R α	0,0175		
10	<i>IL15RA</i>	rs3136615	C:G	CG-GG	IL15 Libre	0,0430		

Tabla S1: Estadística de Mann-Whitney entre los datos de genotipos, alelos o condición de ser portador de un alelo con la expresión de IL-15 e IL-15R α . Se tomó como correlación significativa un valor de p menor que 0,05. ¹ Alelo de menor frecuencia en negrita. * Parámetros que resultaron significativos en la correlación de Spearman. # Polimorfismos asociados significativamente con la enfermedad celiaca en el estudio previo. Cr, cromosoma; SNP, polimorfismo de un único nucleótido; IL, interleucina; B, banda; KDa, kilodaltons; ARNm, expresión del ácido ribonucleico mensajero.

Cr	Gen	SNP	Alelos ¹	GENOTIPOS		PORTADORES	
				Grupos	p	Alelo	p
10	<i>IL15RA</i>	rs2229135	A:G	AG-GG	0,0441*	A	0,0441*
10	<i>IL15RA</i>	rs2296141	A:G	AG-GG	0,0441*	A	0,0441*

Tabla S2: Estadística de Mann-Whitney entre los datos de genotipos o condición de ser portador de un alelo u otro con el momento de diagnóstico de los pacientes celiacos (en la edad infantil o en la edad adulta). Se tomó como correlación significativa un valor de p menor que 0,05. ¹ Alelo de menor frecuencia en negrita. * Parámetros que resultaron significativos en la correlación de Spearman. Cr, cromosoma; SNP, polimorfismo de un único nucleótido; IL, interleucina.

```

V1      MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICN 60
V2      MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICN 60
510pb  MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATR----- 29
276pb  MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATR----- 29

V1      SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAHVHQRPAAPPSTVTTAGVIPQPE 120
V2      SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR----- 95
510pb  ----- 29
276pb  ----- 29

V1      SLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTA 180
V2      -----PAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTA 147
510pb  -----EPAASSPSSNNTAATTAAIIPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTA 82
276pb  ----- 29

V1      KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVE 240
V2      KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVE 207
510pb  KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVE 142
276pb  -----VAISTSTVLLYGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVE 64

V1      MEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 267
V2      MEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 234
510pb  MEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 169
276pb  MEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 91

```

Figura S4: Alineamiento de las secuencias proteicas predecidas de las variantes 1 y 2. V, variante; pb, pares de bases.

```

V3      MSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRD 60
498pb  MSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR- 59
348pb  -----MPSKSPSTG----- 9
130pb  ----- 29

V3      PALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPELSLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSK 120
498pb  ----- 29
348pb  ----- 29
130pb  ----- 29

V3      SPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC 180
498pb  -----TTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC 114
348pb  -----TTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC 64
130pb  ----- 29

V3      GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 231
498pb  GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 165
348pb  GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 115
130pb  -----MEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL 27

```

Figura S5: Alineamiento de las secuencias proteicas predecidas de la variante 3. Sólo se muestra la proteína predecida de 130 pb a partir del segundo ATG ya que el primero cambia el marco de lectura. V, variante; pb, pares de bases.

A)

TOTAL	N	Edad media	Edad mínima	Edad máxima	Mujeres
Control	25	40,26	12	86	65,22 %
Controles patológicos	16	38,63	19	62	43,75 %
EC infantiles	13	3,39	1	9	61,54 %
EC ad activos	9	36,78	21	69	88,89 %
EC ad DSG	11	41,27	15	67	72,73 %
EC refractarios	6	66,33	61	71	66,67 %
Total	80	36,01	1	86	63,92 %

B)

qPCR	N	Edad media	Edad mínima	Edad máxima	Mujeres
Control	12	39,92	12	86	58,33 %
Controles patológicos	12	39,92	19	62	50,00 %
EC infantiles	7	3,63	1	9	42,86 %
EC ad activos	5	36,60	21	69	80,00 %
EC ad DSG	9	41,89	15	67	66,67 %
EC refractarios	5	67,40	63	71	60,00 %
Total	50	37,61	1	86	58,00 %

C)

Western blot	N	Edad media	Edad mínima	Edad máxima	Mujeres
Control	17	41,00	12	86	64,71 %
Controles patológicos	14	40,21	19	62	50,00 %
EC infantiles	8	4,30	1	9	50,00 %
EC ad activos	10	37,38	21	69	87,50 %
EC ad DSG	8	41,50	15	67	70,00 %
EC refractarios	6	66,33	61	71	66,67 %
Total	63	38,20	1	86	63,49 %

D)

Citometría de flujo	N	Edad media	Edad mínima	Edad máxima	Mujeres
Control	9	40,78	31	69	66,67 %
Controles patológicos	2	27,50	27	28	0,00 %
EC infantiles	-	N/A	N/A	N/A	N/A
EC ad activos	3	44,33	32	69	100,00 %
EC ad DSG	2	35,50	32	39	50,00 %
EC refractarios	2	68,5	66	71	50,00 %
Total	18	42,39	27	71	61,11 %

Tabla S3: Características de las biopsias duodenales utilizadas en cada técnica: A, Total de muestras; B, qPCR; C, *western blot* y, D, citometría de flujo. N, tamaño de la muestra; qPCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; EC, enfermedad celiaca; ad, adultos; DSG, dieta sin gluten; N/A, no aplicable.

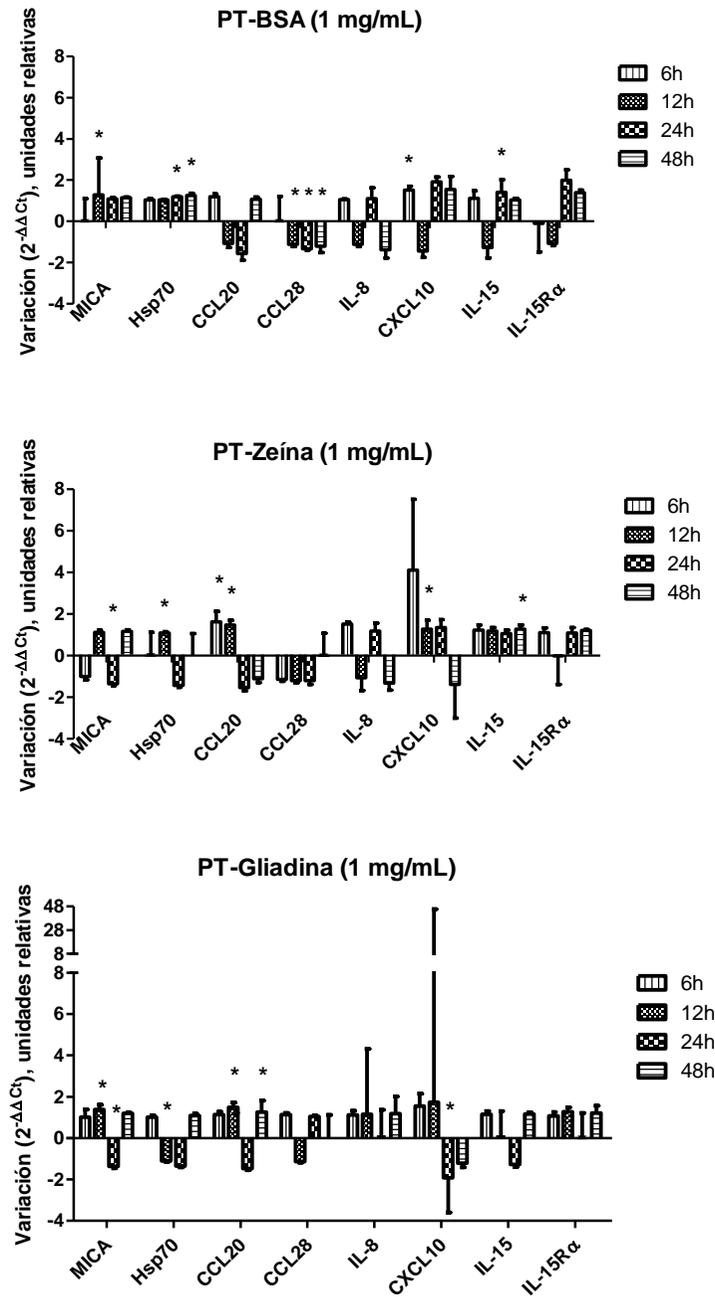


Figura S6: Expresión relativa de quimiocinas y moléculas de estrés, junto con IL-15 y su receptor, en células Caco-2 estimuladas con digeridos de pepsina-tripsina de albúmina sérica bovina (PT-BSA, control), zeína de maíz (PT-zeína, cereal control) y gliadina de trigo (PT-gliadina) durante 6, 12, 24 y 48 horas. Se representa la mediana y el rango intercuartil. * $p < 0,05$ en relación al control basal.

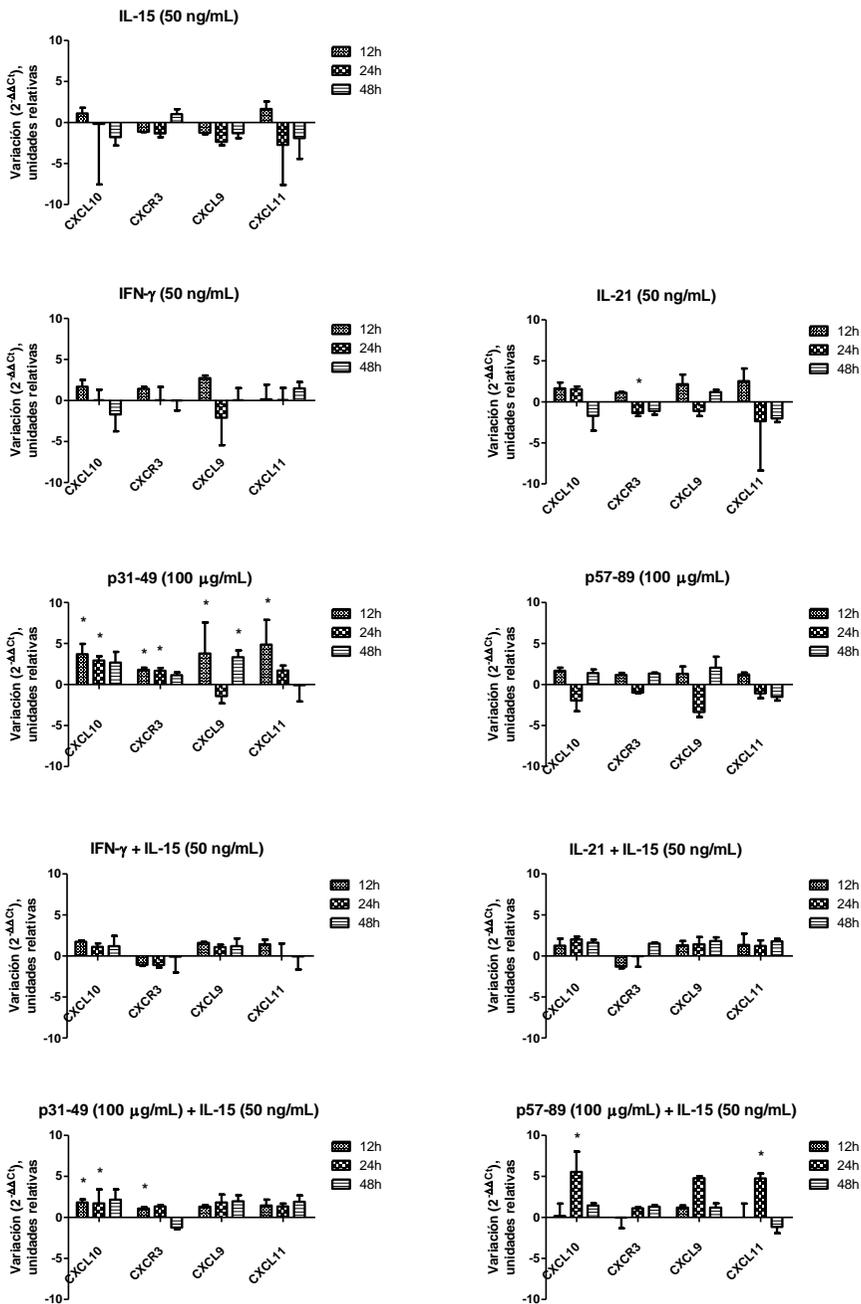


Figura S7: Expresión relativa de moléculas relacionadas con CXCL10 en células Caco-2 estimuladas con citocinas y péptidos de gliadina (p31-49 y p57-89) durante 12, 24 y 48 horas. Se representa la mediana y el rango intercuartil. * $p < 0,05$ en relación al control basal.

X. Bibliografía

1. Husby, S. *et al.* European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **54**, 136-160 (2012).
2. Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* **24**, 115-119 (2007).
3. Real, A. *et al.* Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PloS one* **7**, e48365 (2012).
4. Wieser, H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl* **412**, 3-9 (1996).
5. Dowd, B. & Walker-Smith, J. Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection. *British medical journal* **2**, 45-47 (1974).
6. Gee, S. On the coeliac disease. *St Bart Hosp Rep* **24**, 17-20 (1888).
7. Feighery, C. Fortnightly review: coeliac disease. *BMJ* **319**, 236-239 (1999).
8. Maki, M. & Collin, P. Coeliac disease. *Lancet* **349**, 1755-1759 (1997).
9. Catassi, C. *et al.* Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* **343**, 200-203 (1994).
10. Dubé, C. *et al.* The prevalence of coeliac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* **128**, S57-67 (2005).
11. Kang, J.Y., Kang, A.H., Green, A., Gwee, K.A. & Ho, K.Y. Systematic review: worldwide variation in the frequency of coeliac disease and changes over time. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **38**, 226-245 (2013).
12. Dieli-Crimi, R., Cenit, M.C. & Nunez, C. The genetics of coeliac disease: A comprehensive review of clinical implications. *Journal of autoimmunity* (2015).
13. Kondrashova, A. *et al.* Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against coeliac disease. *Annals of medicine* **40**, 223-231 (2008).
14. Ivarsson, A. *et al.* Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr* **89**, 165-171 (2000).
15. Mariné, M. *et al.* The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **33**, 477-486 (2011).
16. Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C. & Koning, F. Nomenclature and listing of coeliac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* **64**, 455-460 (2012).
17. Rostom, A. *et al.* The diagnostic accuracy of serologic tests for coeliac disease: a systematic review. *Gastroenterology* **128**, S38-46 (2005).

18. Hogen Esch, C.E. *et al.* Childhood coeliac disease: towards an improved serological mass screening strategy. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **31**, 760-766 (2010).
19. Parizade, M. & Shainberg, B. Positive deamidated gliadin peptide antibodies and negative tissue transglutaminase IgA antibodies in a pediatric population: to biopsy or not to biopsy. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **17**, 884-886 (2010).
20. Oberhuber, G., Granditsch, G. & Vogelsang, H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *European journal of gastroenterology & hepatology* **11**, 1185-1194 (1999).
21. [No authors listed] Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Archives of disease in childhood* **65**, 909-911 (1990).
22. Krauss, N. & Schuppan, D. Monitoring nonresponsive patients who have celiac disease. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* **16**, 317-327 (2006).
23. Rubio-Tapia, A. *et al.* Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience. *Gastroenterology* **136**, 99-107; quiz 352-103 (2009).
24. Jamma, S. *et al.* Small intestinal release mesalamine for the treatment of refractory celiac disease type I. *Journal of clinical gastroenterology* **45**, 30-33 (2011).
25. Ludwig, H., Polymenidis, Z., Granditsch, G. & Wick, G. [Association of HL-A1 and HL-A8 with childhood celiac disease]. *Zeitschrift fur Immunitatsforschung, experimentelle und klinische Immunologie* **146**, 158-167 (1973).
26. Greco, L. *et al.* Genome search in celiac disease. *American journal of human genetics* **62**, 669-675 (1998).
27. Holopainen, P. *et al.* Candidate gene region 2q33 in European families with coeliac disease. *Tissue antigens* **63**, 212-222 (2004).
28. Brophy, K. *et al.* Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. *Genes and immunity* **7**, 19-26 (2006).
29. Van Belzen, M.J. *et al.* A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology* **125**, 1032-1041 (2003).
30. Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B. & Jabri, B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annual review of immunology* **29**, 493-525 (2011).
31. van Heel, D.A. *et al.* A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nature genetics* **39**, 827-829 (2007).
32. Dubois, P.C. *et al.* Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature genetics* **42**, 295-302 (2010).

33. Trynka, G. *et al.* Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature genetics* **43**, 1193-1201 (2011).
34. Vader, W. *et al.* The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12390-12395 (2003).
35. Henderson, K.N. *et al.* A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity* **27**, 23-34 (2007).
36. Fallang, L.E. *et al.* Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nature immunology* **10**, 1096-1101 (2009).
37. Mubarak, A. *et al.* Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **56**, 428-430 (2013).
38. Arentz-Hansen, H. *et al.* The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* **191**, 603-612 (2000).
39. Dieterich, W. *et al.* Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine* **3**, 797-801 (1997).
40. Bruce, S.E., Bjarnason, I. & Peters, T.J. Human jejunal transglutaminase: demonstration of activity, enzyme kinetics and substrate specificity with special relation to gliadin and coeliac disease. *Clin Sci (Lond)* **68**, 573-579 (1985).
41. Biagi, F. *et al.* Transglutaminase 2 in the enterocytes is coeliac specific and gluten dependent. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **38**, 652-658 (2006).
42. Lebreton, C. *et al.* Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* **143**, 698-707 e691-694 (2012).
43. Kim, C.Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C. & Sollid, L.M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4175-4179 (2004).
44. Jabri, B. & Sollid, L.M. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 858-870 (2009).
45. van de Wal, Y. *et al.* Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* **161**, 1585-1588 (1998).
46. Luciani, A. *et al.* Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated

- PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* **59**, 311-319 (2010).
47. Lundin, K.E. *et al.* Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* **178**, 187-196 (1993).
 48. Lundin, K.E., Scott, H., Fausa, O., Thorsby, E. & Sollid, L.M. T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Human immunology* **41**, 285-291 (1994).
 49. Zanoni, G. *et al.* In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS medicine* **3**, e358 (2006).
 50. Farrace, M.G. *et al.* Presence of anti-"tissue" transglutaminase antibodies in inflammatory intestinal diseases: an apoptosis-associated event? *Cell death and differentiation* **8**, 767-770 (2001).
 51. Siegel, M. *et al.* Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PloS one* **3**, e1861 (2008).
 52. Beitnes, A.C. *et al.* Rapid accumulation of CD14+CD11c+ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge. *PloS one* **7**, e33556 (2012).
 53. Monteleone, G. *et al.* Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut* **48**, 425-429 (2001).
 54. Cammarota, G., Cuoco, L., Cianci, R., Pandolfi, F. & Gasbarrini, G. Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet* **356**, 1494-1495 (2000).
 55. George, E.K. *et al.* High frequency of celiac disease in Down syndrome. *The Journal of pediatrics* **128**, 555-557 (1996).
 56. Qiao, S.W. *et al.* Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol* **175**, 254-261 (2005).
 57. Ciccocioppo, R. *et al.* Gliadin and tissue transglutaminase complexes in normal and coeliac duodenal mucosa. *Clinical and experimental immunology* **134**, 516-524 (2003).
 58. Nilsen, E.M. *et al.* Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* **115**, 551-563 (1998).
 59. Salvati, V.M. *et al.* Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* **50**, 186-190 (2002).
 60. Fina, D. *et al.* Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut* **57**, 887-892 (2008).
 61. Di Niro, R. *et al.* High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic

- hypermethylation in celiac disease intestinal lesions. *Nature medicine* **18**, 441-445 (2012).
62. Brandtzaeg, P. The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunology letters* **105**, 127-139 (2006).
63. Mesin, L., Sollid, L.M. & Di Niro, R. The intestinal B-cell response in celiac disease. *Frontiers in immunology* **3**, 313 (2012).
64. Farstad, I.N., Carlsen, H., Morton, H.C. & Brandtzaeg, P. Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics. *Immunology* **101**, 354-363 (2000).
65. Sollid, L.M., Molberg, O., McAdam, S. & Lundin, K.E. Autoantibodies in celiac disease: tissue transglutaminase--guilt by association? *Gut* **41**, 851-852 (1997).
66. Matysiak-Budnik, T. *et al.* Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* **205**, 143-154 (2008).
67. Alaedini, A. & Green, P.H. Autoantibodies in celiac disease. *Autoimmunity* **41**, 19-26 (2008).
68. Sardy, M., Karpati, S., Merkl, B., Paulsson, M. & Smyth, N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med* **195**, 747-757 (2002).
69. Qiao, S.W., Iversen, R., Raki, M. & Sollid, L.M. The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol* **34**, 523-540.
70. Hadjivassiliou, M. *et al.* Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol* **64**, 332-343 (2008).
71. Menard, S. *et al.* Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *The American journal of pathology* **180**, 608-615 (2012).
72. Zimmer, K.P. *et al.* Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut* **59**, 300-310 (2010).
73. Nanayakkara, M. *et al.* Enterocyte proliferation and signaling are constitutively altered in celiac disease. *PloS one* **8**, e76006 (2013).
74. Peterson, L.W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology* **14**, 141-153 (2014).
75. Bevins, C.L. & Salzman, N.H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 356-368 (2011).
76. Abreu, M.T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature reviews. Immunology* **10**, 131-144 (2010).
77. Elinav, E., Henao-Mejia, J. & Flavell, R.A. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. *Mucosal immunology* **6**, 4-13 (2013).
78. Loo, Y.M. & Gale, M., Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680-692 (2011).

79. Sander, L.E. *et al.* Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* **474**, 385-389 (2011).
80. He, B. *et al.* Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* **26**, 812-826 (2007).
81. Xu, W. *et al.* Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nature immunology* **8**, 294-303 (2007).
82. Benjamin, J.L., Sumpter, R., Jr., Levine, B. & Hooper, L.V. Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. *Cell host & microbe* **13**, 723-734 (2013).
83. Daniel, H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual review of physiology* **66**, 361-384 (2004).
84. Shan, L. *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **297**, 2275-2279 (2002).
85. Clemente, M.G. *et al.* Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* **52**, 218-223 (2003).
86. Schumann, M. *et al.* Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut* **57**, 747-754 (2008).
87. Rescigno, M. & Di Sabatino, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of clinical investigation* **119**, 2441-2450 (2009).
88. Visser, J., Rozing, J., Sapone, A., Lammers, K. & Fasano, A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1165**, 195-205 (2009).
89. Bracken, S., Byrne, G., Kelly, J., Jackson, J. & Feighery, C. Altered gene expression in highly purified enterocytes from patients with active coeliac disease. *BMC genomics* **9**, 377 (2008).
90. Bethune, M.T., Siegel, M., Howles-Banerji, S. & Khosla, C. Interferon-gamma released by gluten-stimulated celiac disease-specific intestinal T cells enhances the transepithelial flux of gluten peptides. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **329**, 657-668 (2009).
91. Mazumdar, K. *et al.* Visualization of transepithelial passage of the immunogenic 33-residue peptide from alpha-2 gliadin in gluten-sensitive macaques. *PloS one* **5**, e10228 (2010).
92. Lammers, K.M. *et al.* Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* **135**, 194-204 e193 (2008).
93. Palova-Jelinkova, L. *et al.* Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1beta via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF-kappaB signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation. *PloS one* **8**, e62426 (2013).

94. Bondar, C. *et al.* Role of CXCR3/CXCL10 Axis in Immune Cell Recruitment into the Small Intestine in Celiac Disease. *PLoS one* **9**, e89068 (2014).
95. Hue, S. *et al.* A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* **21**, 367-377 (2004).
96. Barone, M.V. *et al.* Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut* **56**, 480-488 (2007).
97. Junker, Y. *et al.* Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med* **209**, 2395-2408 (2012).
98. Terrazzano, G. *et al.* Gliadin regulates the NK-dendritic cell cross-talk by HLA-E surface stabilization. *J Immunol* **179**, 372-381 (2007).
99. Cheroutre, H., Lambolez, F. & Mucida, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature reviews. Immunology* **11**, 445-456 (2011).
100. Qiu, Y. & Yang, H. Effects of Intraepithelial Lymphocyte-Derived Cytokines on Intestinal Mucosal Barrier Function. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* (2013).
101. Cheroutre, H. In IBD eight can come before four. *Gastroenterology* **131**, 667-670 (2006).
102. Kutlu, T. *et al.* Numbers of T cell receptor (TCR) alpha beta+ but not of TcR gamma delta+ intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut* **34**, 208-214 (1993).
103. Spencer, J. *et al.* Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulations in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine). *Gut* **30**, 339-346 (1989).
104. Halstensen, T.S., Scott, H. & Brandtzaeg, P. Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scandinavian journal of immunology* **30**, 665-672 (1989).
105. Arranz, E., Bode, J., Kingstone, K. & Ferguson, A. Intestinal antibody pattern of coeliac disease: association with gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential coeliac disease. *Gut* **35**, 476-482 (1994).
106. Leon, F. Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Journal of immunological methods* **363**, 177-186 (2011).
107. Guehler, S.R., Finch, R.J., Bluestone, J.A. & Barrett, T.A. Increased threshold for TCR-mediated signaling controls self reactivity of intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* **160**, 5341-5346 (1998).
108. Han, A. *et al.* Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells and gammadelta T cells in celiac disease.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 13073-13078 (2013).
109. Meresse, B. *et al.* Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* **203**, 1343-1355 (2006).
 110. Maiuri, L. *et al.* Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* **362**, 30-37 (2003).
 111. Calleja, S. *et al.* Dynamics of non-conventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and gammadelta T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology. *Digestive diseases and sciences* **56**, 2042-2049 (2011).
 112. Caligiuri, M.A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461-469 (2008).
 113. Middendorp, S. & Nieuwenhuis, E.E. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal immunology* **2**, 393-402 (2009).
 114. Colgan, S.P., Hershberg, R.M., Furuta, G.T. & Blumberg, R.S. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13938-13943 (1999).
 115. Godfrey, D.I. & Kronenberg, M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of clinical investigation* **114**, 1379-1388 (2004).
 116. Abadie, V. & Jabri, B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunological reviews* **260**, 221-234 (2014).
 117. Pagliari, D. *et al.* The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: A bridge between innate and adaptive immune response. *Cytokine & growth factor reviews* (2013).
 118. Meresse, B. *et al.* Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* **21**, 357-366 (2004).
 119. Martin-Pagola, A. *et al.* MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics* **56**, 549-554 (2004).
 120. Ohteki, T., Suzue, K., Maki, C., Ota, T. & Koyasu, S. Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nature immunology* **2**, 1138-1143 (2001).
 121. Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F. & Tough, D.F. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol* **167**, 1179-1187 (2001).
 122. Sarra, M. *et al.* IL-15 positively regulates IL-21 production in celiac disease mucosa. *Mucosal immunology* **6**, 244-255 (2013).
 123. Bernardo, D. *et al.* Higher constitutive IL15R alpha expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. *Clinical and experimental immunology* **154**, 64-73 (2008).

124. Coquet, J.M. *et al.* IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol* **178**, 2827-2834 (2007).
125. Bodd, M. *et al.* HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal immunology* **3**, 594-601 (2010).
126. van Leeuwen, M.A. *et al.* Increased production of interleukin-21, but not interleukin-17A, in the small intestine characterizes pediatric celiac disease. *Mucosal immunology* **6**, 1202-1213 (2013).
127. Benahmed, M. *et al.* Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology* **132**, 994-1008 (2007).
128. Ben Ahmed, M. *et al.* IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* **182**, 6763-6770 (2009).
129. Peluso, I. *et al.* IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **178**, 732-739 (2007).
130. Burton, J.D. *et al.* A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4935-4939 (1994).
131. Grabstein, K.H. *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264**, 965-968 (1994).
132. Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine & growth factor reviews* **17**, 259-280 (2006).
133. Duitman, E.H., Orinska, Z., Bulanova, E., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha. *Molecular and cellular biology* **28**, 4851-4861 (2008).
134. Anderson, D.M. *et al.* Chromosomal assignment and genomic structure of Il15. *Genomics* **25**, 701-706 (1995).
135. Onu, A., Pohl, T., Krause, H. & Bulfone-Paus, S. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J Immunol* **158**, 255-262 (1997).
136. Bamford, R.N., Battiata, A.P., Burton, J.D., Sharma, H. & Waldmann, T.A. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2897-2902 (1996).
137. Bamford, R.N., DeFilippis, A.P., Azimi, N., Kurys, G. & Waldmann, T.A. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J Immunol* **160**, 4418-4426 (1998).
 138. Anderson, D.M. *et al.* Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *The Journal of biological chemistry* **270**, 29862-29869 (1995).
 139. Dubois, S. *et al.* Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *The Journal of biological chemistry* **274**, 26978-26984 (1999).
 140. Diniz, S.N. *et al.* Tissue-specific expression of IL-15RA alternative splicing transcripts and its regulation by DNA methylation. *European cytokine network* **21**, 308-318 (2010).
 141. Muller, J.R., Waldmann, T.A., Kruhlak, M.J. & Dubois, S. Paracrine and transpresentation functions of IL-15 are mediated by diverse splice versions of IL-15Ralpha in human monocytes and dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* **287**, 40328-40338 (2012).
 142. Giri, J.G. *et al.* Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *The EMBO journal* **13**, 2822-2830 (1994).
 143. Carson, W.E. *et al.* Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* **180**, 1395-1403 (1994).
 144. Johnston, J.A. *et al.* Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8705-8709 (1995).
 145. Ratthe, C. & Girard, D. Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15Ralpha chain. *Journal of leukocyte biology* **76**, 162-168 (2004).
 146. Bulanova, E. *et al.* The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J Immunol* **167**, 6292-6302 (2001).
 147. Bulfone-Paus, S., Bulanova, E., Budagian, V. & Paus, R. The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**, 362-377 (2006).
 148. Tagaya, Y., Burton, J.D., Miyamoto, Y. & Waldmann, T.A. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *The EMBO journal* **15**, 4928-4939 (1996).

149. Bernard, J. *et al.* Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *The Journal of biological chemistry* **279**, 24313-24322 (2004).
150. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* **17**, 537-547 (2002).
151. Neely, G.G. *et al.* Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling. *J Immunol* **172**, 4225-4234 (2004).
152. Olsen, S.K. *et al.* Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 37191-37204 (2007).
153. Nishimura, H. *et al.* A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 19-28 (2005).
154. Di Sabatino, A., Calarota, S.A., Vidali, F., Macdonald, T.T. & Corazza, G.R. Role of IL-15 in immune-mediated and infectious diseases. *Cytokine & growth factor reviews* **22**, 19-33 (2011).
155. Cassatella, M.A. & McDonald, P.P. Interleukin-15 and its impact on neutrophil function. *Current opinion in hematology* **7**, 174-177 (2000).
156. van Leeuwen, E.M., Sprent, J. & Surh, C.D. Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Current opinion in immunology* **21**, 167-172 (2009).
157. Imamichi, H., Sereti, I. & Lane, H.C. IL-15 acts as a potent inducer of CD4(+)CD25(hi) cells expressing FOXP3. *European journal of immunology* **38**, 1621-1630 (2008).
158. Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* **204**, 1849-1861 (2007).
159. Mohamadzadeh, M. *et al.* Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* **194**, 1013-1020 (2001).
160. Hoontrakoon, R. *et al.* Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **26**, 404-412 (2002).
161. Maiuri, L. *et al.* IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *The American journal of gastroenterology* **96**, 150-156 (2001).
162. Liu, Z. *et al.* IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* **164**, 3608-3615 (2000).

163. Bouchaud, G. *et al.* Interleukin-15 and its soluble receptor mediate the response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **138**, 2378-2387 (2010).
164. Park, M.K. *et al.* IL-15 promotes osteoclastogenesis via the PLD pathway in rheumatoid arthritis. *Immunology letters* **139**, 42-51 (2011).
165. Knevel, R. *et al.* Genetic variants in IL15 associate with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis: a multicohort study. *Annals of the rheumatic diseases* **71**, 1651-1657 (2012).
166. Duffin, K.C. & Krueger, G.G. Genetic variations in cytokines and cytokine receptors associated with psoriasis found by genome-wide association. *The Journal of investigative dermatology* **129**, 827-833 (2009).
167. Ruckert, R. *et al.* Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol* **165**, 2240-2250 (2000).
168. Chen, J. *et al.* Insulin-dependent diabetes induced by pancreatic beta cell expression of IL-15 and IL-15Ralpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 13534-13539 (2013).
169. Aringer, M. *et al.* Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **40**, 876-881 (2001).
170. Gomez-Nicola, D., Spagnolo, A., Guaza, C. & Nieto-Sampedro, M. Aggravated experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-15 knockout mice. *Experimental neurology* **222**, 235-242 (2010).
171. Wu, X., Pan, W., He, Y., Hsuchou, H. & Kastin, A.J. Cerebral interleukin-15 shows upregulation and beneficial effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* **223**, 65-72 (2010).
172. Carroll, H.P., Paunovic, V. & Gadina, M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 1269-1277 (2008).
173. Stacey, A.R. *et al.* Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *Journal of virology* **83**, 3719-3733 (2009).
174. Dunn, C. *et al.* Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **137**, 1289-1300 (2009).
175. Meier, U.C. *et al.* Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *Journal of virology* **79**, 12365-12374 (2005).
176. Gill, N. & Ashkar, A.A. Adaptive immune responses fail to provide protection against genital HSV-2 infection in the absence of IL-15. *European journal of immunology* **37**, 2529-2538 (2007).

-
177. Sandau, M.M., Kohlmeier, J.E., Woodland, D.L. & Jameson, S.C. IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J Immunol* **184**, 35-44 (2010).
178. Saito, K. *et al.* Impaired protection against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection in IL-15-deficient mice. *J Immunol* **176**, 2496-2504 (2006).
179. Ashkar, A.A., Reid, S., Verdu, E.F., Zhang, K. & Coombes, B.K. Interleukin-15 and NK1.1+ cells provide innate protection against acute *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the gut and in systemic tissues. *Infection and immunity* **77**, 214-222 (2009).
180. Ochoa, M.C. *et al.* Interleukin-15 in gene therapy of cancer. *Current gene therapy* **13**, 15-30 (2013).
181. Waldmann, T.A. The biology of IL-15: implications for cancer therapy and the treatment of autoimmune disorders. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* **16**, S28-30 (2013).
182. Lebec, H. *et al.* Homeostasis of human NK cells is not IL-15 dependent. *J Immunol* **191**, 5551-5558 (2013).
183. Panes, J. *et al.* Randomized trial of tofacitinib in active ulcerative colitis: analysis of efficacy based on patient-reported outcomes. *BMC gastroenterology* **15**, 14 (2015).
184. Chiricozzi, A. *et al.* Tofacitinib for the treatment of moderate-to-severe psoriasis. *Expert review of clinical immunology* **11**, 443-455 (2015).
185. Boyle, D.L. *et al.* The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* (2014).
186. Hutchins, N.A., Unsinger, J., Hotchkiss, R.S. & Ayala, A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends in molecular medicine* **20**, 224-233 (2014).
187. Croce, M., Orengo, A.M., Azzarone, B. & Ferrini, S. Immunotherapeutic applications of IL-15. *Immunotherapy* **4**, 957-969 (2012).
188. Bernardo, D., Garrote, J.A., Fernandez-Salazar, L., Riestra, S. & Arranz, E. Is gliadin really safe for non-coeliac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-coeliac individuals challenged with gliadin peptides. *Gut* **56**, 889-890 (2007).
189. Sambuy, Y. *et al.* The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology* **21**, 1-26 (2005).
190. Thorisson, G.A., Smith, A.V., Krishnan, L. & Stein, L.D. The International HapMap Project Web site. *Genome research* **15**, 1592-1593 (2005).

191. Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263-265 (2005).
192. Ward, L.D. & Kellis, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic acids research* **40**, D930-934 (2012).
193. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* **81**, 559-575 (2007).
194. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
195. Shabalina, S.A., Spiridonov, N.A. & Kashina, A. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. *Nucleic acids research* **41**, 2073-2094 (2013).
196. Epstein, D.J. Cis-regulatory mutations in human disease. *Briefings in functional genomics & proteomics* **8**, 310-316 (2009).
197. Sollid, L.M. & Jabri, B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nature reviews. Immunology* **13**, 294-302 (2013).
198. Rueda, B., Zhernakova, A., Lopez-Nevot, M.A., Martin, J. & Koeleman, B.P. Association study of functional genetic variants of innate immunity related genes in celiac disease. *BMC medical genetics* **6**, 29 (2005).
199. Sagoo, G.S. *et al.* Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *The Journal of investigative dermatology* **122**, 1401-1405 (2004).
200. Zhang, X.J. *et al.* Polymorphisms in interleukin-15 gene on chromosome 4q31.2 are associated with psoriasis vulgaris in Chinese population. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 2544-2551 (2007).
201. Zouidi, F. *et al.* Association of BANK1 and cytokine gene polymorphisms with type 1 diabetes in Tunisia. *Gene* **536**, 296-301 (2014).
202. Yamamoto-Furusho, J.K. *et al.* Association of the interleukin 15 (IL-15) gene polymorphisms with the risk of developing ulcerative colitis in Mexican individuals. *Molecular biology reports* **41**, 2171-2176 (2014).
203. Yoshida, S. *et al.* Lack of association between IL-15 genetic variants and progression of joint destruction in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **73**, 784-785 (2014).
204. Yin, J. *et al.* Interleukin 15 receptor alpha rs2228059 A > C polymorphism decreased risk of gastric cardiac adenocarcinoma in a

- Chinese population. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **35**, 6593-6600 (2014).
205. Quintero-Ronderos, P. & Montoya-Ortiz, G. Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune diseases* **2012**, 593720 (2012).
206. Zhou, Y., Lu, Y. & Tian, W. Epigenetic features are significantly associated with alternative splicing. *BMC genomics* **13**, 123 (2012).
207. Wu, X. *et al.* Expression and signaling of novel IL15Ralpha splicing variants in cerebral endothelial cells of the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* **114**, 122-129 (2010).
208. Karatzas, P.S., Gazouli, M., Safioleas, M. & Mantzaris, G.J. DNA methylation changes in inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology* **27**, 125-132 (2014).
209. Vaira, V. *et al.* microRNA profiles in coeliac patients distinguish different clinical phenotypes and are modulated by gliadin peptides in primary duodenal fibroblasts. *Clin Sci (Lond)* **126**, 417-423 (2014).
210. Magni, S. *et al.* miRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in celiac disease. *The American journal of gastroenterology* **109**, 1662-1674 (2014).
211. Diosdado, B. *et al.* High-resolution array comparative genomic hybridization in sporadic and celiac disease-related small bowel adenocarcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 1391-1401 (2010).
212. Roostae, A. *et al.* Histone Deacetylase Inhibition Impairs Normal Intestinal Cell Proliferation and Promotes Specific Gene Expression. *Journal of cellular biochemistry* (2015).
213. Forn, M. *et al.* Overlapping DNA methylation dynamics in mouse intestinal cell differentiation and early stages of malignant progression. *PloS one* **10**, e0123263 (2015).
214. Johnson, I.T. & Belshaw, N.J. The effect of diet on the intestinal epigenome. *Epigenomics* **6**, 239-251 (2014).
215. Steegenga, W.T. *et al.* Sexually dimorphic characteristics of the small intestine and colon of prepubescent C57BL/6 mice. *Biology of sex differences* **5**, 11 (2014).
216. Fuchs, A. *et al.* Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity* **38**, 769-781 (2013).
217. Mention, J.J. *et al.* Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* **125**, 730-745 (2003).
218. Caruso, R. *et al.* Analysis of the cytokine profile in the duodenal mucosa of refractory coeliac disease patients. *Clin Sci (Lond)* **126**, 451-458 (2014).

219. Monteleone, I. *et al.* Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in coeliac disease mucosa. *Gut* **53**, 1090-1095 (2004).
220. Mazzarella, G. *et al.* Constitutive activation of the signal transducer and activator of transcription pathway in celiac disease lesions. *The American journal of pathology* **162**, 1845-1855 (2003).
221. Sperandeo, M.P. *et al.* Potential celiac patients: a model of celiac disease pathogenesis. *PloS one* **6**, e21281 (2011).
222. Ota, N., Takase, M., Uchiyama, H., Olsen, S.K. & Kanagawa, O. No requirement of trans presentations of IL-15 for human CD8 T cell proliferation. *J Immunol* **185**, 6041-6048 (2010).
223. Perdreau, H. *et al.* Different dynamics of IL-15R activation following IL-15 cis- or trans-presentation. *European cytokine network* **21**, 297-307 (2010).
224. Maiuri, L. *et al.* Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* **119**, 996-1006 (2000).
225. Di Sabatino, A. *et al.* Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* **55**, 469-477 (2006).
226. Kokkonen, T.S., Augustin, M.T., Kokkonen, J., Karttunen, R. & Karttunen, T.J. Serum and tissue CD23, IL-15, and FasL in cow's-milk protein-sensitive enteropathy and in coeliac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **54**, 525-531 (2012).
227. Benito-Zamorano, V. *et al.* in XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología, Vol. 29 (SEI, San Sebastián (Spain); 2010).
228. Bergamaschi, C. *et al.* Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum. *Blood* **120**, e1-8 (2012).
229. Vincentini, O. *et al.* Environmental factors of celiac disease: cytotoxicity of hulled wheat species *Triticum monococcum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum* and *T. aestivum* ssp. *spelta*. *Journal of gastroenterology and hepatology* **22**, 1816-1822 (2007).
230. Sapone, A. *et al.* Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC medicine* **9**, 23 (2011).
231. Hollon, J. *et al.* Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients* **7**, 1565-1576 (2015).
232. Kawaguchi, H., Akazawa, Y., Watanabe, Y. & Takakura, Y. Permeability modulation of human intestinal Caco-2 cell monolayers by interferons. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **59**, 45-50 (2005).
233. Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y. & Schneider, Y.J. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of

- stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **24**, 1441-1449 (2010).
234. Drago, S. *et al.* Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scandinavian journal of gastroenterology* **41**, 408-419 (2006).
235. Rauhavirta, T. *et al.* Impaired epithelial integrity in the duodenal mucosa in early stages of celiac disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **164**, 223-231 (2014).
236. Lindfors, K. *et al.* Live probiotic Bifidobacterium lactis bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clinical and experimental immunology* **152**, 552-558 (2008).
237. Juuti-Uusitalo, K. *et al.* Inhibition of epithelial growth factor receptor signalling does not preserve epithelial barrier function after in vitro gliadin insult. *Scandinavian journal of gastroenterology* **44**, 820-825 (2009).
238. Vallejo-Díez, S. in Tesis doctoral: Degradación específica del gluten por la mucosa intestinal de los pacientes celíacos: posible papel en la patogenia y en el diagnóstico de la enfermedad. (Universidad de Valladolid, Valladolid; 2013).
239. Gopalakrishnan, S. *et al.* Larazotide acetate regulates epithelial tight junctions in vitro and in vivo. *Peptides* **35**, 86-94 (2012).
240. Gopalakrishnan, S., Tripathi, A., Tamiz, A.P., Alkan, S.S. & Pandey, N.B. Larazotide acetate promotes tight junction assembly in epithelial cells. *Peptides* **35**, 95-101 (2012).
241. Eun, C.S. *et al.* Lactobacillus casei prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **119**, 49-56 (2011).
242. Liu, H., Wang, P., Cao, M., Li, M. & Wang, F. Protective role of oligomycin against intestinal epithelial barrier dysfunction caused by IFN-gamma and TNF-alpha. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **29**, 799-808 (2012).
243. Cao, M., Wang, P., Sun, C., He, W. & Wang, F. Amelioration of IFN-gamma and TNF-alpha-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway. *PloS one* **8**, e61944 (2013).
244. Capozzi, A. *et al.* Modulatory Effect of Gliadin Peptide 10-mer on Epithelial Intestinal CACO-2 Cell Inflammatory Response. *PloS one* **8**, e66561 (2013).
245. Roy, I., Evans, D.B. & Dwinell, M.B. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery* **155**, 961-973 (2014).
246. Szekanecz, Z., Kim, J. & Koch, A.E. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Seminars in immunology* **15**, 15-21 (2003).

247. Trynka, G. *et al.* Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut* **58**, 1078-1083 (2009).
248. Kontakou, M., Przemioslo, R.T., Sturgess, R.P., Limb, A.G. & Ciclitira, P.J. Expression of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-2 mRNA in the jejunum of patients with coeliac disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **30**, 456-463 (1995).
249. Owaki, T. *et al.* STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J Immunol* **180**, 2903-2911 (2008).
250. Zheng, S.G. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? *American journal of clinical and experimental immunology* **2**, 94-106 (2013).
251. Brottveit, M. *et al.* Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *The American journal of gastroenterology* **108**, 842-850 (2013).
252. Lahat, N. *et al.* Cytokine profile in coeliac disease. *Scandinavian journal of immunology* **49**, 441-446 (1999).
253. Merendino, R.A. *et al.* Relationship between IL-18 and sICAM-1 serum levels in patients affected by coeliac disease: preliminary considerations. *Immunology letters* **85**, 257-260 (2003).
254. Manavalan, J.S. *et al.* Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Human immunology* **71**, 50-57 (2010).
255. Tack, G.J. *et al.* Serum parameters in the spectrum of coeliac disease: beyond standard antibody testing--a cohort study. *BMC gastroenterology* **12**, 159 (2012).
256. Bjorck, S., Lindehammer, S.R., Fex, M. & Agardh, D. Serum cytokine pattern in young children with screening detected coeliac disease. *Clinical and experimental immunology* **179**, 230-235 (2015).
257. Kawaguchi, S. *et al.* Retinoic acid-inducible gene-I is constitutively expressed and involved in IFN-gamma-stimulated CXCL9-11 production in intestinal epithelial cells. *Immunology letters* **123**, 9-13 (2009).
258. Di Paolo, M.C., Merrett, M.N., Crotty, B. & Jewell, D.P. 5-Aminosalicylic acid inhibits the impaired epithelial barrier function induced by gamma interferon. *Gut* **38**, 115-119 (1996).
259. Lionetti, P. *et al.* Differing patterns of transforming growth factor-beta expression in normal intestinal mucosa and in active celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **29**, 308-313 (1999).
260. Leon, A.J. *et al.* Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. *Clinical and experimental immunology* **146**, 479-485 (2006).

-
261. Gujral, N., Suh, J.W. & Sunwoo, H.H. Effect of anti-gliadin IgY antibody on epithelial intestinal integrity and inflammatory response induced by gliadin. *BMC immunology* **16**, 41 (2015).
262. Przemioslo, R.T., Kontakou, M., Nobili, V. & Ciclitira, P.J. Raised pro-inflammatory cytokines interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in coeliac disease mucosa detected by immunohistochemistry. *Gut* **35**, 1398-1403 (1994).
263. Harris, K.M., Fasano, A. & Mann, D.L. Cutting edge: IL-1 controls the IL-23 response induced by gliadin, the etiologic agent in celiac disease. *J Immunol* **181**, 4457-4460 (2008).
264. Kontakou, M. *et al.* Cytokine mRNA expression in the mucosa of treated coeliac patients after wheat peptide challenge. *Gut* **37**, 52-57 (1995).
265. Hansson, T., Dannaeus, A. & Klareskog, L. Cytokine-producing cells in peripheral blood of children with coeliac disease secrete cytokines with a type 1 profile. *Clinical and experimental immunology* **116**, 246-250 (1999).
266. Sapone, A. *et al.* Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *International archives of allergy and immunology* **152**, 75-80 (2010).
267. Lahdenpera, A.I., Falth-Magnusson, K., Hogberg, L., Ludvigsson, J. & Vaarala, O. Expression pattern of T-helper 17 cell signaling pathway and mucosal inflammation in celiac disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **49**, 145-156 (2014).
268. Monteleone, I. *et al.* Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. *J Immunol* **184**, 2211-2218 (2010).
269. Lettesjo, H., Hansson, T., Bergqvist, A., Gronlund, J. & Dannaeus, A. Enhanced interleukin-18 levels in the peripheral blood of children with coeliac disease. *Clinical and experimental immunology* **139**, 138-143 (2005).

XI. Notas

