

tesis  
doctoral



Interacciones  
innato-adaptativas  
en el sistema inmune  
y su relacion con  
la patogenia de la  
enfermedad  
celiaca



Universidad  
de Valladolid  
IbGM



David Bernardo Ordiz  
2008











UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Departamento de Pediatría, Inmunología  
Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología,  
Psiquiatría e Historia de la Ciencia

FACULTAD DE MEDICINA  
Avda. Ramón y Cajal nº 5; 47005-VALLADOLID  
Tlf: 983 42 31 86 / Fax: 983 18 38 12  
e-mail: pediatría@med.uva.es

**Don EDUARDO ARRANZ SANZ**, Doctor en Medicina y Cirugía, Investigador del programa Ramón y Cajal en la Universidad de Valladolid y **Don JOSE ANTONIO GARROTE ADRADOS**, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de Inmunología de la Universidad de Valladolid, e Investigador del Sistema Nacional de Salud en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

**CERTIFICAN:** que Don **DAVID BERNARDO ORDIZ** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación de Tesis Doctoral sobre el tema **”INTERACCIONES INNATO-ADAPTATIVAS EN EL SISTEMA INMUNE Y SU RELACIÓN CON LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD CELIACA”** para optar al grado de Doctor.

El trabajo reúne a nuestro juicio las condiciones de rigor y originalidad metodológica necesarios para que pueda ser leído y defendido públicamente ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valladolid, a 12 de marzo de dos mil ocho.

Fdo. Don Eduardo Arranz Sanz

Fdo. Don Jose Antonio Garrote Adrados



*No murieron, porque son maestros en el arte de la supervivencia. Pero no se les debe buscar flotando libremente en el mar; ellos renunciaron a esa desenvuelta libertad hace mucho tiempo. Ahora, abundan en grandes colonias, a salvo dentro de gigantescos y lerdos robots, encerrados y protegidos del mundo exterior, comunicándose con él por medio de rutas indirectas y tortuosas, manipulándolo por control remoto. Se encuentran en ti y en mí; ellos nos crearon, cuerpo y mente; y su preservación es la razón última de nuestra existencia. Aquellos replicadores han recorrido un largo camino. Ahora se les conoce con el término de genes, y nosotros somos sus máquinas de supervivencia.*

-Richard Dawkins-

El Gen Egoísta





# *AGRADECIMIENTOS*



Han pasado más de 6 años, y sin embargo aún recuerdo mi primer día en un laboratorio. ¡Como para olvidarlo! Salíamos del examen de Embriología y atrás se habían quedado muchas conversaciones con Millán buscando un grupo para ser alumnos internos. Como todo el mundo, recuerdo perfectamente aquella tarde en la que yo también contuve la respiración. Era 11 de Septiembre de 2001, y por fin empezaba mi camino por la investigación. Cuando ahora giro la vista atrás, apenas me parece que ha pasado tiempo. Todo se ha ido en un suspiro. Aun recuerdo mi primer experimento, cuando Mauro me tuvo equilibrando Fenol y agitando aquella pesada botella durante un cuarto de hora. Buena novatada, sí señor.

Durante más de 3 años tuve el lujo de disfrutar de la maravillosa compañía de todas las personas del Área de Genética de la Universidad de Oviedo, y del grupo de Genética Acuícola en especial.

José Antonio y Gloria. Nunca podréis saber lo agradecido que os estaré por haberme brindado la oportunidad de trabajar con vosotros. Me habéis enseñado mucho más de lo que pensáis, y sobre todo, me habéis apoyado siempre, incluso cuando os dije que me quería cambiar al campo de la celiaca. Siempre os consideraré mis jefes Asturianos.

Gracias a Jorge (con r), por tu apoyo, tu compañía y tus puntos de vista que nunca paran de sorprenderme gratamente. Yaisel, que me acercas tu Cuba querida con tus relatos, Agustín, por las interminables discusiones sobre ciencia y política, y Miguel, por ser mi maestro en la Genética de Poblaciones. Los 4 aprendisteis a lidiar conmigo, lo cual aseguro que es muy difícil. Compañeros y amigos en el trabajo además de en los Veranos, el Sella, las Navidades, las sidras o las escapadas a Pucela. He aprendido cosas de cada uno y siempre os consideraré mi grupo de Oviedo. Gracias por vuestra amistad y vuestro constante apoyo.

Dani, cómplice de mil aventuras, y no sólo en la Facultad o en el labo. Cuantas juergas conjuntas en tantos lugares diferentes, y en las que irremediamente siempre acabamos hablando de biología a esas horas en las que la noche pierde su nombre. Muchas gracias por rescatarme cuando lo necesitaba.

Fer, ahora perdido en Barcelona, y compañero de viajes por Washington y Alemania. Otro enamorado de la genética de la conservación y de aquellas interminables veladas al PES. Y por supuesto Mar. Gracias por la visita a Ámsterdam. Os deseo a los dos todo lo mejor en la vida.

Pero la vida de mi amada Oviedo, con Carce, Bea, Aida, “parásitos”, veladas al PES, bebidas y otras cosas incluidas se ha quedado atrás. La protagonista de esta Tesis es Valladolid, donde pude ejercer mi pasión por investigar la Celiaca. Gracias a todos mis compañeros en esta ciudad.

Eduardo y Garrote. Gracias. Me habéis dado la oportunidad de mi vida. Me habéis guiado sabiamente, y sobretodo me habéis protegido y animado cuando más lo necesitaba. Jamás me habéis cortado las alas, y me habéis dado libertad en todo momento para desarrollar mis propias ideas. Siempre os estaré eternamente agradecido por ello. Desde luego, esta Tesis jamás hubiese sido posible sin vuestra sabia guía. No os considero mis jefes. Sois mis maestros, mis amigos, mis compañeros.

Alfredo Blanco, que sabes guiar maravillosamente bien el Departamento. Eres una gran persona, y no lo digo sólo porque también seas asturiano y del Sporting.

Alberto León. Sólo puedo quitarme el sombrero. Tú solito montaste gran parte de las técnicas del labo y jamás tuviste un mal gesto o una mala actitud en lo referente a enseñarme. Gracias. Mucha suerte en tu periplo Chino.

Emma. Tu maravillosa forma de ser y de ver la vida realmente me cautivó. Aunque no lo creas he aprendido muchas cosas en tu compañía.

Fer, ahora atrapado en Madrid. Sin tu inestimable ayuda, aquel asturiano torpe al que ni siquiera entendáis cuando hablaba jamás hubiese podido desarrollar su Tesis.

Menchu. Siempre estuviste dispuesta a echarme una mano cuando me veías apurado o lo necesitaba. Realmente gracias por aguantarme en el labo, y por rescatarnos a Elisa y a mí cuando nos quedamos en esta ciudad. Que tengas mucha suerte en tu nuevo campo.

Jesús, mi instructor en el campo de la Biología Celular. Gracias por haberme guiado en mis primeros pasos en la inmunología y por compartir conmigo sin dilación tus ideas y sugerencias. Mucha suerte en tu nueva aventura.

Bea, la sufridora que ahora tiene que soportarme. Tu constancia y lo metódica que eres realmente me ha impresionado. Estoy seguro que obtendrás unos resultados fascinantes en tu Tesis Doctoral.

Todos los residentes, técnicos y alumnos internos que habéis pasado por aquí en estos últimos años. Muchas gracias por vuestra buena predisposición a aprender, y sobre todo por vuestras preguntas que me servían de excusa para hablar de lo que más me apasiona: la biología. Un saludo especial para Anita, Nuria, Nora, Rubén, Carmen, Isabel y Sara. Y por supuesto a Paloma, que viniste a aprender y te quedaste a colaborar con nosotros.

Gracias también al resto de la gente de inmuno: Alfredo, Eloína y Rita, que siempre me atienden cada vez que me asalta alguna duda.

Toda la gente de Micro, que siempre me reciben con los brazos abiertos y dispuestos a colaborar. Un abrazo especial a Orduña, Fabiola, Sandra, y por supuesto a Afri. No cambies nunca chiquilla. Eres una de las mejores personas que conozco y con la que realmente se puede disfrutar de una conversación.

Todo el IBGM, y sobre todo a la gente de “La Mama” y de “Metabolopatías”, siempre dispuesta a perder su tiempo atendiendo las estúpidas preguntas del Astu. Un fuerte abrazo para toda la tropa, con quien siempre nos echamos unas risas. Gracias por ser tan buenos compañeros, Eladio, Merche, Mar, David, Noemí, Lucía, Lara, Juanjo, David, Chus, Isa, Blanca, alberto, Isabel, Visi, Marian. También a Diego y Lola, que siempre me habéis atendido sin vacilación.

Obviamente, es de rigor dar las gracias también a todas las entidades que de una u otra forma han colaborado en la financiación de esta Tesis Doctoral. El MEC, con su beca de colaboración y la FPU, la universidad de Valladolid, por la beca Fin de Tesis, y por supuesto a Phadia, afiliada a Sweden Diagnosticss (gracias Juan) y a la ACM (un beso Manuela). También, a todos los clínicos, que me han suministrado sin vacilación el material biológico que necesitaba. Un fuerte abrazo a Luis, Carmen, Sabino, Benito, Salvador, María Luisa y Chris. Y sobre todo a lo pacientes, sin cuyas preciosas muestras jamás podríamos comprender un poquito más qué es eso de la Celiaca. Un abrazo especial a Raquel, celiaca, donadora de muestras y amiga.

Pero no todos son compañeros de trabajo. Pelayón ¿quién nos iba a decir que la vida nos reuniría de nuevo en Valladolid? Hemos descubierto juntos la vida nocturna de Valladolid... alguno más que el otro. Y por supuesto a Montse, asturiana de adopción. Muchas gracias Pelayón por estar siempre ahí y ser un apoyo en el *extranjero*. Gracias también a Bruno y Fernando, con quienes la colonia Asturiana empieza a expandirse y tantas veces me han rescatado en mi zulo a última hora para desquitar las penas con un buen Ribera. Por supuesto a la gente del Centro Asturiano, donde siempre te acogen para disfrutar de una buena botellina, y como no a Domingo, a quien siempre acabo visitando cuando salgo por esta ciudad.

Una mención especial se merecen todas y cada una las visitas que me han brindado mis amigos en Valladolid. Muchas gracias a todos los que os quedasteis unos días en la Embajada de Sotrandio en Valladolid, o bien estabais de paso y parabais a saludar y tomar algo. Gracias por acercarme mi amada tierrina a Pucela. Siempre recordaré aquel gélido y fatídico Sábado de Enero con Javi, Natalia, Javi Rionda, Conchi, Isaac y Elisa. Pero nos dio igual. Sabíamos que éramos los vencedores morales, y como tal lo celebramos con monólogos de Ron.

Gracias también a toda la gente que me escuchó cuando estaba agobiado y necesitaba hablar. Muchas gracias a Ivanín, Davizón, David, Sonia, Raquel (ahora como amiga), Lolo, Susi, Eli, Dani, Patty, Omar, Andrea, Santos, Pili, Marta, Luis, Vi, Bea, Ese, Carmen, Neal, Dolores, Gus, Leti, Pedrín, Belén, Ana Patricia, Aroa, Javi (maestro de las Artes Gráficas y diseñador de la portada), Jandro, Yasmina, Sergín, Tino, Bea, JGel, Aroa, JMan, Noe, Pedro, Davison, Dani... y por supuesto a Manolín! por estar siempre dispuesto a echarnos un culete, aunque seas un pelín callado.

A lo largo de estos años, mi vida investigadora me ha permitido visitar lugares que me cambiaron cada uno un poquito. Madrid, el Escorial, Barcelona, Granada, New York, Washington, Buenos Aires, Londres. Estos viajes me llevaron a ciudades que desde luego no me han dejado indiferente, y no lo digo sólo por lo aprendido a nivel profesional, sino por la belleza de cada una. Gracias a todos los que me habéis acompañado en los viajes, las cenas, las visitas, la vida nocturna... y sobre todo por escucharme cuando me pongo pesado y me pongo a hablar de la celiaca, de si la gliadina es mala en todo el mundo, de si las Dendríticas son las comandantes en jefe de la respuesta o de si las iNKT van a ser el futuro. Gracias de nuevo a Miguel, Jorge, Pelayón, Eduardo y Garrote, y como no a las María Jesuses, mujeres de los *jeffes* y buenas amigas. Gracias a David-inmuno y al grupo de HLA del HUCA, sobre todo a Rober (compañero de instituto primero, y ahora otro loco que se dedica a la Ciencia), por la compañía en Granada. Saludos a Alejandra, Yessi, Naty, Manuel, Fernando y Claudia, por acompañarme en Argentina. Carme Farré ya veterana conmigo en varias ciudades y congresos, Gemma, Juan, Luís Menchén (atrapados en el JFK), Isabel Polanco, Luis Rodrigo, Santi Vivas y Chema, con quienes descubrí NY y que ahora me aguantan cada poco hablando de la de inmunología de la Celiaca. Y como no, un saludo al resto de la gente que trabaja en Celiaca en España y que me ha sugerido ideas para trabajar. Gracias a Garbi, Yolanda Sanz (por dejarme colaborar contigo) y sobre todo a Carolina Sousa y Manuel Mejía, por haberme orientado allá en 2004 cuando un asturiano loco se quería cambiar a la celiaca.

Pero un lugar tiene ocupado una gran parte de mi corazón: mi amada Ámsterdam, que como dice la canción, trajo a otro vistiendo mi cuerpo.

*Thank you very much, Mary, Ingrid, Rijk, Marco, Hetty, Wieke, Petra, Chris, Salvador and the rest of the people of the Vrije Universiteit Medisch Centrum. You everybody gave the opportunity of learning a lot, not only about science but also about your country and your culture. Thank you for introducing me in the intriguing world of Dendritic cells or veiled cells, as I recently learnt to call them, and of course for allowing me to discover the fascinating iNKT cells. Special thanks to Salvador. It was always a pleasure explaining to the Netherlanders that the best red wines all over the world are made in Valladolid. Thanks also for introducing me to Stella C. Knight in this new period of my life.*

Gracias, por supuesto, a toda la colonia hispana, tanto de Ámsterdam como de Bochum. De verdad que os llevo a todos y a cada uno de vosotros en lo más profundo de mi corazón. Muchas gracias por hacerme sentir como en casa a 3.000 km de distancia de mi gente, mi familia, y de mi chica. Juan, porque eres una de las mejores personas que conozco. Nunca cambies de verdad, eres un tío que merece la pena. Josean, me alegro que por fin hayas podido volverte a Euskadi. Seguro que las cosas te irán muy bien. María, gracias por echarme una mano con la gente del CCA cuando lo necesitaba. Begoña, compañera en Patología y en la celiaca. Gracias por ir a salvarme cuando lo necesitaba. Yayito, Nacho, Sonia, Paco, Marta... con quien siempre estaba bien tomarse las cañas de los viernes. Y por supuesto a la gente que me aguantó en el Hospitium. Gracias a Jorge. Quién me iba a decir que me iba a encontrar otro asturiano en Ádam, y además amigo de amigos míos... Y sobre todo a Laia, ahora en el exilio madrileño. Muchas gracias por las aventuras juntos, las bicis y *Yonkis bridge*, la excursión a Delft y La Haya y sobre todo por las mil conversaciones apoyándonos conjuntamente.

Por supuesto a todos mis familiares, directos y políticos, que me quieren y siempre me han apoyado... aunque no todos hayan llegado a ver este punto y seguido. Pero sobre todo a ti, Isaac. No sólo eres mi hermano, eres mi amigo, y se que siempre estarás ahí. Gracias por ser la mejor persona que conozco.

A Mis viejos, papi y mami. Os dije una vez que os debía todo lo que soy, forma y esencia. Y es cierto. Me habéis enseñado que no hay nadie en el mundo mejor ni superior a mí, pero también, como dice G<sup>a</sup> Márquez, que sólo tengo derecho a mirar a otro hacia abajo si es para ayudarlo a levantarse. En los últimos años me he ido distanciando y haciéndome cada vez más hermético. Pero me habéis sabido comprender. Me apoyasteis en todo, jamás me habéis fallado y os estaré eternamente agradecido. Cuando se me pregunta, se me hace la boca pequeña para decir con orgullo que soy el hijo de un ama de casa y un minero que lo han dado todo por sus hijos. Sólo espero que vuestros nietos se sientan algún día la mitad de orgullosos de mí, como yo lo estoy de vosotros. ¡Gracias viejos!

Pero no todo ha sido felicidad. Muchas veces me pregunté si de verdad valía la pena. Ha habido momentos de duda, de bajón, de desesperación. Días en los que me planteaba colgar la bata. Pero tú siempre estuviste ahí. A mi lado. Me animaste a pedir la beca de colaboración. Comprendiste que necesitaba irme a vivir a Oviedo. Me dijiste que diese el salto a Valladolid a trabajar en lo que ansiaba o que me arrepentiría el resto de mi vida. Me alentaste cuando me tuve que marchar a Ámsterdam porque era bueno para mi formación, e incluso ahora me apoyas en la que será mi nueva etapa, como post-Doc. Esta tesis es más tuya que mía. Viniste a compartir los buenos momentos cuando te llamaba, y me apoyaste cuando lo necesité sin necesidad de pedírtelo. Saltabas conmigo de alegría cuando te decía que aquellas bandas eran bacterianas, y te enfadabas como yo cuando te decía que un *referee* capullo que no tenía ni idea me había tirado un *paper*. Sin ti, nada de esto hubiese sido posible. Gracias por haber arrojado luz en mi vida cuando lo necesité. Ahora compartimos mucho más juntos, y espero seguir caminando junto a ti el resto de mi vida. Porque tú has sido la verdadera artífice de esta tesis Doctoral. Muchas gracias, Elisa, por darle sentido a mi vida.

Y creo que va siendo hora de cortar esto. No os voy a aburrir más con mis sentimientos, si es que algún loco se ha leído de verdad todos estos agradecimientos. Es hora de que empiece el resumen de estos últimos años de mi vida.

Valderas, 9 de Marzo de 2008 a las 13.30...

Creo que me voy a salir a tomar un vino mientras espero a Elisa.

# *ÍNDICE*





<b>CAPÍTULO I: Introducción</b>	<b>1</b>
La Enfermedad Celiaca	3
Tolerancia Oral	5
Células Dendríticas	6
Células iNKT	7
Antecedentes de la EC	9
Evolución histórica de la EC	9
La EC en el mundo	9
EC clásica y modelo del iceberg	12
Hipótesis Metabólica como explicación a la EC	13
Teoría Inmunológica de la EC	15
Base genética de la EC	15
El modelo de las dos señales	16
Respuesta innata	16
Respuesta adaptativa	16
Mecanismos de inflamación en la EC	19
Más allá de la respuesta innata: Interacción IL15/IL15R $\alpha$	21
Enfermedad Celiaca Refractaria	23
Justificación	25
Bibliografía	27
<b>CAPÍTULO II: Objetivos</b>	<b>37</b>
Objetivos	39
<b>CAPÍTULO III: Material y Métodos</b>	<b>41</b>
Sujetos de estudio y obtención de muestras	43
Procesamiento de las muestras de sangre periférica	45
Aislamiento y purificación de poblaciones celulares de sangre periférica	45
Congelado y descongelado de las células	45
Tinción celular y análisis por citometría	46
Procesamiento de las muestras de biopsia duodenal	47
Cultivo de biopsias y ensayos de estimulación	47
Determinación de mediadores de inflamación en los sobrenadantes de cultivo	48
Obtención de sub-poblaciones de las biopsias intestinales	49
Reactivos utilizados	49
Análisis Molecular	50
PCR cuantitativa	50
Western-Blot	53
Zimografía	53
Estudios de Inmunofluorescencia	54
Bibliografía	55
<b>CAPÍTULO IV: ¿Realmente la gliadina es inocua para los no celíacos?</b>	<b>57</b>
Introducción	59
Material y Métodos	61
Sujetos de estudio	61
Cultivo de biopsia y obtención de sub-poblaciones linfocitarias	61
Análisis por citometría	61
Cultivo de biopsia y análisis molecular	62
Estudios de PCR cuantitativa y determinación de nitritos	62
Western-blot de IL-15	62

Resultados	63
Moléculas de activación en poblaciones linfocitarias intestinales	63
CD30 es un marcador de activación intestinal en respuesta a gliadina mediado por IL-15	63
La gliadina es un inductor de IL-15	65
Los mediadores innato-adaptativos únicamente están alterados en los pacientes EC	66
Discusión	69
Bibliografía	73
<u>CAPÍTULO V: Menor umbral de respuesta a IL-15 en EC</u>	<u>77</u>
Introducción	79
Material y métodos	81
Sujetos de estudio	81
Preparación de muestras	81
Cultivos de biopsia	81
Western-blot de IL-15	82
Estudios de inmunofluorescencia	82
Estudios de PCR cuantitativa	82
Moléculas efectoras en los sobrenadantes	82
Análisis estadístico	83
Resultados	84
Los pacientes EC expresan niveles más elevados de mRNA de IL15R $\alpha$	84
Expresión tisular de IL15R $\alpha$	85
El mRNA de IL15R $\alpha$ es inducido por IL-15 únicamente en los pacientes no-EC	85
Mayor respuesta inmunológica a IL-15 en los pacientes EC	87
Mayor expresión basal de mediadores pro-inflamatorios en los pacientes EC	87
Discusión	89
Bibliografía	93
<u>CAPÍTULO VI: Menores niveles de células iNKT circulantes en pacientes refractarios</u>	<u>95</u>
Introducción	97
Material y Métodos	100
Análisis por citometría de células de sangre periférica	100
Análisis estadístico	101
Resultados	102
Análisis fenotípico de las células T homeostáticas	102
Los pacientes con EC y ECR tienen niveles normales de células T $\gamma\delta$ y Treg circulantes	103
Las células iNKT se encuentran disminuidas en los pacientes ECR	104
La reducción de células iNKT no está relacionada con la presencia de células aberrantes intraepiteliales o el desarrollo de linfoma intestinal	105
Las células iNKT circulantes presentan valores normales en los pacientes con EC, tanto en actividad como tratados en DSG	106
Fenotipo regulador de las células iNKT en la EC	107
Discusión	109
Bibliografía	113
<u>CAPÍTULO VII: Mayor balance de iNKT/Treg en el duodeno celiaco</u>	<u>117</u>
Introducción	119
Material y Métodos	121
Resultados	122

Mayor ratio Vα24/Treg en el duodeno celiaco	122
Correlación entre la expresión de Vα24 y daño tisular	122
Correlación entre la expresión de Vα24 e IFNγ	123
Discusión	125
Bibliografía	128
<b><u>CAPÍTULO VIII: Digestión diferencial de la gliadina por la mucosa intestinal de los pacientes celíacos.</u></b>	<b>131</b>
Introducción	133
Material y Métodos	135
Sujetos de estudio	135
Preparación de muestras	135
Cultivo de biopsia	135
Aislamiento leucocitario	135
Análisis de Zimografía	136
Fingerprinting y espectrometría de masas de trampa iónica	136
Microbiota asociada a las biopsias duodenales	136
Análisis estadístico	137
Resultados	138
Proteasas que degradan gliadina específicas del duodeno celiaco	138
Las proteasas que degradan gliadina tienen actividad post-prolina	140
Naturaleza metaloproteasa de las enzimas identificadas	142
Las proteasas que degradan gliadina son de origen bacteriano	143
Discusión	146
Bibliografía	150
<b><u>CAPÍTULO IX: Inhibición de la respuesta innata: ¿Un tratamiento basado en el ascorbato?</u></b>	<b>153</b>
Introducción	155
Material y Métodos	157
Resultados	158
Discusión	160
Bibliografía	162
<b><u>CAPÍTULO X: Discusión</u></b>	<b>165</b>
Resumen	167
La IL-15 juega un papel inicial en la respuesta celiaca	168
¿Por qué no todos somos celíacos?	169
Células de la inmunidad innata y enfermedad celiaca	170
Genética de la EC	175
Factores ambientales en la EC: ¿Podrían ser importantes las bacterias?	177
Nuevas alternativas terapéuticas a la EC	178
Bibliografía	180
<b><u>CAPÍTULO XI: Conclusiones</u></b>	<b>185</b>
Conclusiones	187
<b><u>CAPÍTULO XII: Anexos</u></b>	<b>189</b>
Currículum del autor	191



# *CAPÍTULO I*

## *INTRODUCCIÓN*



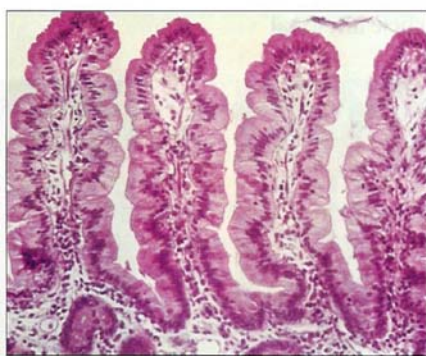
## **LA ENFERMEDAD CELIACA**

La Enfermedad Celiaca (EC) es una hipersensibilidad tipo IV, mediada por linfocitos T CD4+ de la lámina propia del intestino delgado en individuos genéticamente susceptibles con un perfil TH1 de citocinas con predominio de IFN $\gamma$  y ausencia de IL-12, a la fracción proteica soluble en alcohol del endospermo de las triticáceas (trigo, cebada y centeno) y probablemente avena (1,2).

La EC es la intolerancia alimentaria más común en nuestro país, con una prevalencia en torno al 0,25-1% de la población (3-5). Sin embargo únicamente están diagnosticados 1 de cada 7 ó 10 del total de los afectados (6). Se desencadena en personas genéticamente susceptibles cuando ingieren la fracción proteica, o gluten, de las semillas del trigo, cebada, centeno y probablemente avena. Como consecuencia, se produce una lesión e inflamación de la mucosa del intestino delgado superior que provoca un déficit en la absorción y utilización de nutrientes cuya repercusión clínica y funcional es variable según el grado de atrofia de la mucosa intestinal (Figura I.1).

**Figura I.1**

**a)**



**b)**



Mucosa duodenal de un paciente control no-EC (a) y de un paciente EC al momento del diagnóstico (b) con atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas al microscopio óptico.

En la observación de la respuesta inmune intestinal al gluten suelen reconocerse varias fases interrelacionadas en la lesión, descritas como fases de lesión de Marsh en reconocimiento a quien las describió (7). El tipo 0 sería el de una mucosa normal no inflamada. El tipo 1 está caracterizado por una linfocitosis intraepitelial, mientras que el tipo 2 también implica una hiperplasia de las criptas. El tipo 3 añade además es una lesión destructiva, que puede ser parcial (3a), sub-total

(3b) o total (3c). Por último, el tipo 4 es una lesión hipoplásica donde la atrofia total de las vellosidades va acompañada por una hipoplasia de las criptas (7)

El único tratamiento disponible en la actualidad es la dieta sin gluten (DSG), que suele llevar asociada una respuesta con mejoría clínica generalmente espectacular tras la eliminación del trigo, cebada y centeno de la dieta, así como todos sus productos derivados (1,2). Sin embargo, el mantenimiento de la DSG no es una tarea sencilla, no sólo por el elevado coste económico que implica, sino porque el gluten del trigo es un componente esencial de la alimentación española que se usa además frecuentemente como un aditivo, lo que dificulta el cumplimiento de la DSG y facilita su ingestión de forma inadvertida. El problema de las transgresiones en la dieta, voluntarias o involuntarias dada la dificultad de compaginarla con la vida social, es que pueden implicar la no recuperación del intestino delgado y el mantenimiento de la sintomatología o, lo que es más grave, la aparición de una forma de EC que no responde a la DSG, o EC refractaria, donde se cronifica la inflamación y puede llevar asociada una alta tasa de incidencia de linfomas intestinales asociados (8,9).

En consecuencia, el desarrollo de terapias alternativas y puntuales a la DSG que faciliten compaginar la vida social con la DSG evitando el desarrollo de la respuesta inmune cuando se ingiere gluten o, incluso, mediante la re-inducción de la tolerancia oral perdida frente al gluten supondría un tremendo alivio para todos los pacientes EC. Para ello es fundamental conocer mejor los mecanismos responsables que activan la inmunidad innata y comprender como ésta consigue activar la inmunidad adaptativa y le pérdida de la tolerancia oral de forma selectiva únicamente en los pacientes EC.



## TOLERANCIA ORAL

La tolerancia oral es la falta de respuesta inmunológica frente a los antígenos de la dieta tras su administración por vía sistémica (10). El objetivo último es prevenir una respuesta inmunológica frente a antígenos inocuos. Sin embargo, en la EC el sistema inmune del intestino pierde la tolerancia oral frente al gluten, y desencadena una respuesta inmunológica.

La capacidad del sistema inmune del tracto digestivo para distinguir entre antígenos de la dieta y microorganismos patógenos (inmunógenos), puede explicarse si estos últimos proporcionan un estímulo persistente, o invaden tejidos linfoides alejados de la mucosa. Sin embargo, los mecanismos que subyacen en la base de la tolerancia oral aún hoy permanecen desconocidos. Las propias células T parecen ser la principal diana de los mecanismos de la tolerancia ya que la reducción de la respuesta mediada por anticuerpos a los antígenos de la dieta es debida principalmente a la reducción de las células T cooperadoras (11). Los principales mecanismos mediante los cuales actúa la tolerancia oral incluyen la delección clonal (apoptosis de las células efectoras), la anergia clonal (inactivación funcional de las células efectoras) y la inducción de células T reguladoras, que ejercerían su función mediante citocinas (TGF $\beta$  o IL-10) (12, 13)

Las Células Dendríticas (CD) son las principales células presentadoras de antígeno (CPA). Actualmente se sabe que cuando estas CPA realizan una presentación antigénica a linfocitos T en ausencia de otras señales co-estimuladoras, se favorece la inducción de tolerancia (14, 15). En este sentido, es sabido que los propios enterocitos pueden actuar como CPAs al ser capaces de expresar moléculas HLA tipo II, aunque en ausencia de otras señales co-estimuladoras. En consecuencia, las moléculas así presentadas también favorecerían el desarrollo de los fenómenos de tolerancia (16, 17). Ambos tipos de presentación antigénica favorecen la diferenciación de células T reguladoras (Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) (18, 19). Estas células Treg han sido consideradas tradicionalmente como las principales células homeostáticas del sistema inmune en general, y de la homeostasis intestinal en particular, al controlar en última instancia el desarrollo de la tolerancia oral. Realizan su función al bloquear la expansión clonal de las células T clásicas, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, pero además inhiben la producción de IL-2. Recientemente se ha identificado un factor de transcripción clave en el desarrollo, maduración y función de dichas células Treg, el factor FoxP3, que se ha convertido

en el distintivo de dicha población celular (20, 21, 22). Las células Treg tienen un papel central en el control de la inflamación local, al inhibir las respuestas TH1 y la producción de IFN $\gamma$  con la consiguiente transformación de la mucosa, además de cooperar con las células B en la síntesis local de IgA. (12, 23).

En la actualidad se considera que junto a las células Treg, las células T $\gamma\delta$ <sup>+</sup> y las células NKT invariantes (iNKT) son importantes en los fenómenos de mantenimiento y regulación de la homeostasis intestinal, además de las CD, y por tanto, en la tolerancia oral. Los linfocitos intraepiteliales T $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, que además contribuyen significativamente al *pool* de células circulantes, juegan un papel crucial en la inducción de la tolerancia oral, ya que son necesarios para inducir diferenciación de las células Treg (24, 25). Tras el reconocimiento antigénico de los antígenos de la dieta mediante su TCR, las células T $\gamma\delta$ <sup>+</sup> expresan de forma rápida y transitoria el receptor CCR7 que les permitirá migrar a los nódulos linfáticos donde pueden actuar como CPA e inducir la diferenciación de las células Treg (26) específicas de los antígenos de la dieta.

Sin embargo, en la inducción de la tolerancia oral un papel más relevante corresponde a las células iNKTs, ya que la interacción entre las CDs y las iNKTs es muy importante para la correcta diferenciación de células Treg tolerogénicas productoras de IL10 y TGF $\beta$  frente a los antígenos de la dieta y por tanto el desarrollo de la tolerancia oral (23).

### **Células Dendríticas**

Las CDs son claves tanto en los fenómenos de homeostasis intestinal (12, 27, 28), como en la interacción entre las respuestas innata y adaptativa (29, 30). En consecuencia, podrían tener también un papel clave en la inmunopatogénesis de la EC. Estas células son capaces de madurar en respuesta a señales de peligro o derivadas de la inmunidad innata, y trasladar esta señal de peligro a una inducción de una respuesta por células T y por tanto de la inmunidad adaptativa (31, 12).

Las CDs, son las CPA más potentes que existen, y tienen la capacidad única de iniciar tanto respuestas inmunológicas como tolerogénicas (32-37). Los precursores de las CDs migran desde la médula ósea a prácticamente todos los tejidos del organismo, incluyendo la mucosa intestinal. Una vez en su destino, son capaces de reconocer señales en su entorno y captar antígenos. Estas CDs inmaduras y sésiles, tienen una alta expresión de receptores que son muy eficientes

para capturar antígenos y procesarlos (38, 39). Sin embargo, cuando adquieren un “antígeno de peligro” o “señal de maduración”, las CDs pierden su sesilidad y su alta capacidad de carga a la vez que empiezan a migrar hacia los órganos linfoides secundarios debido a su expresión de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión (33, 39). Durante su migración, las CDs irán madurando, lo que se manifiesta en cambios en la expresión de numerosos antígenos de superficie celular. Así pasarán a expresar marcadores de activación, como CD83, además de incrementar la expresión en superficie de los péptidos que han procesado gracias al aumento de las moléculas HLA-clase II, como puede ser el DQ2. De igual forma, aumentan también los niveles de expresión de moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras como CD40, ligando de CD40L, o CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2), que interactúan con las células T a través de CD28, para activar una respuesta inmunológica efectora (40). Por tanto, una vez en los tejidos linfoides secundarios, habrán perdido su capacidad para capturar antígenos, pero serán extremadamente eficientes en la presentación antigénica y en estimulación de linfocitos T vírgenes, verdaderos efectores de la respuesta inmunológica.

Por oposición, y en el caso de haber tomado muestras de antígenos no patógenos en el intestino, estas células no incrementarán la expresión ni de las moléculas HLA-clase II ni de las moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD83 y/o CD86) durante su proceso de migración a los nódulos linfáticos, por lo que tras realizar la presentación antigénica inducirán la proliferación de linfocitos T antígeno-específicos de función reguladora.

### **Células iNKT**

Las células NKT invariantes (iNKT) constituyen en torno al 0,1% del total de células circulantes (41). Son una subpoblación celular que comparte marcadores de superficie de células NK como CD161 (NK1.1) junto con un TCR invariante V $\alpha$ 24 $\beta$ 11 que sólo reconoce antígenos presentados en el contexto de la molécula MHC-I CD1d, muy expresada por las células epiteliales del intestino (42-46). Pese a que no se sabe su número exacto dentro del compartimento intraepitelial, probablemente varían entre el 0,5% y el 20% (47,48), estas células tienen un carácter dual que les hace jugar un gran papel en la respuesta inmunológica; por un lado las células iNKT CD4-CD8- producen un perfil de citocinas TH1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) tras su activación, mientras que las iNKTs CD4+ pueden producir tanto un perfil TH1 como TH2 (IL4 e

IL13) (19, 49-51). Debido a su capacidad única para producir de forma rápida grandes cantidades tanto de citocinas TH1 (IFN $\gamma$ ) como TH2 (IL4) tras su estimulación, las células iNKTs, juegan un papel crucial en la tolerancia oral (52), ya que promueven la diferenciación de células T reg productoras de IL-10 y TGF $\beta$ , además inducir la depleción clonal de células T específicas de antígeno (23) debido a su capacidad de modular a las propias CDs (19). De hecho, la inducción de la tolerancia oral puede ser revertida cuando se produce la co-estimulación de las CDs que han sido activadas por la iNKTs (53). Finalmente, modelos murinos que no expresan la población de células iNKT hepáticas son incapaces de desarrollar tolerancia oral ante cualquier antígeno ingerido, lo que confirma su importancia en este proceso (54).

El que las células iNKT adquieran un perfil activador (TH1), o uno homeostático (TH2), dependerá de la fuerza de interacción entre el antígeno y la molécula presentadora CD1d, el microambiente local (presencia de citocinas reguladoras /inflamatorias), y la existencia de otras señales coestimuladoras (45). En situaciones normales, la ingestión de proteínas de la dieta, en un ambiente libre de infección o inflamación, hace que la presentación de antígeno mediada por los enterocitos a través de moléculas CD1d lleve a la inducción de fenómenos de tolerancia oral, por ausencia de otras moléculas co-estimuladoras, como CD40, CD80, CD83 o CD86. Por tanto, las iNKTs podrán modular a las CDs (45, 55) para diferenciarlas hacia células dendríticas tolerogénicas que promuevan la diferenciación de células T reguladoras productoras de IL-10 y TGF $\beta$  frente a los antígenos de la dieta, e inducir, de esta forma, la tolerancia oral.

Pese a que el papel de estas células en la inmunopatogénesis de la EC no está demostrado, dichas células se pueden localizar en el compartimento intraepitelial (47, 48, 56, 57). Adicionalmente, la población CD3- con fenotipo *NK-like* ha sido descrita como el segundo subconjunto de linfocitos más abundante en el compartimento intraepitelial, estando además drásticamente disminuida en los pacientes con EC (58, 59). Todos estos datos, conjuntamente con la posibilidad que presentan las células iNKT de secretar grandes cantidades de IFN $\gamma$ , sin mediar IL-12, en respuesta a un estímulo innato como ocurre en la EC, convierte a las células iNKT en una población a tener muy en cuenta en el futuro en el estudio de la inmunopatogénesis de la EC.

## **ANTECEDENTES DE LA EC**

### **Evolución histórica de la EC**

La EC fue descrita por primera vez en la segunda mitad del Siglo II AC por Aretaeus de Cappadocia, contemporáneo del médico romano Galeno. En sus escritos, usó la voz griega *koeliakos*, que significa “que sufren del intestino”, precursora de la voz actual celiaco o *coeliac*, en inglés. (60).

Sin embargo, la descripción clásica de la EC tuvo que esperar hasta el año 1888. Samuel Gee del Hospital St. Bartholomew hizo la primera descripción clínica, precisa y detallada de la EC tal y como la conocemos hoy día, e incluso aconsejó una reducción de la ingesta de harinas para controlar los efectos (61). Aun así, la causa de la enfermedad permaneció desconocida durante más de 50 años con pocos avances relativos al tratamiento de la enfermedad, siendo probablemente el más efectivo de todos cuantos se probaron la dieta basada en plátanos maduros (62), lo que llevó a establecer que los hidratos de carbono procedentes de frutas y verduras eran bien tolerados por los enfermos celiacos. El pediatra neerlandés WK Dicke desentrañó por fin en su tesis doctoral defendida en la Universidad de Utrecht, el agente etiológico de la patología (63). Dicke, observó en los años de la Segunda Guerra Mundial de escasez de los alimentos básicos como el trigo, que los pacientes celiacos mejoraron espectacularmente para luego recaer tras el fin de la Guerra con la reintroducción en la dieta holandesa de dicho alimentos (63). Esto, junto al hecho de que algunos pacientes celiacos habían desarrollado aversión a algunos alimentos ricos en gluten, le llevó a postular que los cereales (trigo, cebada y centeno) eran agentes etiológicos de la EC, y propuso la dieta estricta sin gluten de por vida, tras la cual se observaba una mejoría espectacular en todos los pacientes celiacos.

### **La EC en el mundo**

La distribución geográfica mundial de la EC parece haber seguido la expansión del cultivo del trigo desde el Creciente Fértil, entre los ríos Tigris y Éufrates, a lo largo de toda la costa Mediterránea, avanzando hasta Escandinavia. Se consideraba que la EC era exclusiva de las poblaciones Europeas, concretamente del fenotipo “ojos azules y pelo rubio” de latitudes más nórdicas. Sin embargo, ahora se sabe que la EC tiene un prevalencia entre el 1% y el 0,25% en todos los países desarrollados de origen Europeo (Europa, Norteamérica y Australia)

(3-5, 64-66). Es interesante señalar que la frecuencia de los portadores del heterodímero HLA-DQ2 (el “gen” de la celiaca) se encuentra aumentada, así como la prevalencia de la EC, en las poblaciones Europeas más alejadas de Oriente Próximo, por donde se introdujo la agricultura en Europa en las migraciones Neolíticas (67).

Sin embargo, se ha visto que la EC no es exclusiva de países Europeos o con un pasado genético Europeo (como Norteamérica y Australia). Nuevos estudios apuntan a una prevalencia similar en países en vías de desarrollo (66-69), donde tradicionalmente no se consumía gluten, pero que como consecuencia de la globalización se está imponiendo una nueva dieta occidental a base de pan, pasta y harinas de trigo. Todas las características hacen que el “fenotipo clásico” de la EC, es decir, pelo rubio y ojos azules (66, 67), pueda abandonarse en favor de un fenotipo derivado de la dieta occidental, que parece ser la verdadera causante del incremento de prevalencia de la EC en todas las sociedades estudiadas. En este sentido, en un margen de 20km entre ambos lados de la frontera en la región de Corelia (compartida entre Finlandia y Rusia y donde no existen diferencias en el acervo genético), se encuentra una incidencia entre 5 y 6 veces mayor en el lado Finlandés señalándose a la dieta occidental como la desencadenante de la EC (M. Maki, conferencia en *Celiac Disease Symposium NY, EEUU, 9-11 Nov 2006*). Un caso similar es el de la denominada “diarrea del verano” que sucede en el norte de la India (66, 67), consecuencia del cambio de dieta que se realiza en dicha estación cuando se abandona la dieta base del resto del año, el maíz. Otro ejemplo de las consecuencias del cambio de la dieta es la población Saharai, con una prevalencia del 5% en su población (70). Se trata de una población que presenta una frecuencia del haplotipo DQ2 similar a las del sur de Italia, aunque el gluten estuvo ausente de su dieta hasta hace pocas décadas.

Actualmente se han descrito, mediante estudios de despistaje serológico en la población general, frecuencias similares a las Europeas en todos los países en vías de desarrollo donde se ha estudiado, incluyendo desde el Norte y el Este de África (Marruecos, Argelia, Túnez, Libia y Egipto), Oriente próximo (Palestina e Irán) o la India hasta Latinoamérica (Argentina, Brasil, Cuba...) (66-69, 71). Pese a que tradicionalmente se consideraba que la EC estaba ausente de todos estos países, estas frecuencias similares a las Europeas, no deben resultar extrañas ya que en definitiva todas las poblaciones tienen un mismo origen genético común proveniente

de las migraciones neolíticas comenzadas en los últimos 10.000 años antes de nuestra Era.

Por tanto, la “epidemia global” de la EC que está sucediendo en todos los países en vías de desarrollo no debe confundirse con un cambio genético en las poblaciones, sino que deriva de la globalización de los hábitos alimentarios que están desplazando a los tradicionales (66, 71). Así, la EC estaba antes igual de extendida en todos los países en desarrollo donde están apareciendo “epidemias” (Latinoamérica, norte de África, Oriente Próximo y Sur de Asia) aunque los síntomas eran mucho más leves y en pocos casos tenía consecuencias graves, lo que implicaba un menor diagnóstico por desconocimiento (66). Sin embargo, con los cambios en la reducción de la lactancia materna protectora (72, 73), y la ingesta cada vez más temprana y más abundante de gluten por la instauración de la dieta occidental, como panes, pastas y harinas de trigo en sociedades donde antes apenas se consumía, existe una mayor sintomatología y por tanto un incremento en el diagnóstico de la EC (66,71). Así, pese a que la prevalencia en todos los países estuvo siempre en torno al 1-0,5%, los cambios en las costumbres alimentarias están implicando un recrudecimiento de la sintomatología, y hacen que la EC deba ser considerada un problema de salud mundial, con la inclusión de todos los grupos étnicos y raciales del mundo donde haya una creciente ingesta de gluten (66, 67, 71).

Es probable por tanto que si la globalización de los hábitos alimenticios continúa, en un futuro próximo aumentará la prevalencia de la EC en todos los países en vías de desarrollo hasta alcanzar prevalencias similares a las europeas (66, 71). Sin embargo, el seguimiento de la dieta sin gluten es muy difícil en estos países tanto por la escasez de alimentos sin gluten como por su elevado precio, lo que sumado a la falta de información y conocimiento de la enfermedad en esas sociedades implica un tratamiento muy difícil. Una posibilidad sería cambiar la dieta base de estos países hacia otros cereales como el arroz, aunque parece que la fuerza de la globalización impediría esa posibilidad. Por tanto, afrontar el difícil tratamiento que tendrá la EC en esos países debería ser considerado un objetivo primario para las organizaciones internacionales de la salud, necesitándose realizar también nuevos esfuerzos para enfrentarse a la EC en este nuevo mundo. Encontrar pues estrategias terapéuticas alternativas más apropiadas para estos países parece imprescindible.

### **La EC clásica y el modelo del iceberg**

La EC clásica representa la menor parte de los pacientes. Estos son los pacientes con EC activa, considerada tradicionalmente exclusiva de pacientes en edad infantil que se caracteriza por una atrofia vellositaria intensa o total (Marsh grado III) al momento de la endoscopia, junto con una serología positiva (anticuerpos anti endomisio y/o anti transglutaminasa (TG2)) (74). Sin embargo, las manifestaciones clínicas de la EC han cambiado con el tiempo, y a la forma clásica se añaden nuevas presentaciones mono- o asintomáticas. La edad del diagnóstico también se ha modificado descubriéndose más tardíamente en el adulto, lo que contradice la concepción clásica de la EC como de afección única en la edad pediátrica. Se han propuesto otras formas no-clásicas de la EC que reciben la determinación de EC silente, latente y potencial (74). La EC silente abarca a todos los individuos que presentan una alteración histológica duodenal, pese a que pueden ser completamente asintomáticos. Suelen incluirse en este grupo a pacientes con enfermedades asociadas e incluso a familiares de primer grado de EC (74). La EC latente es identificada de forma retrospectiva y engloba a aquellos individuos con marcadores serológicos positivos aunque sin atrofia vellositaria al momento de diagnóstico pese a que han tenido las manifestaciones típicas conjuntamente con atrofia intestinal en algún momento de su vida (74). La EC potencial, por último, englobaría a todos aquellos pacientes que no presentan atrofia vellositaria, aunque sí una infiltración leucocitaria (Marsh tipo I) pudiendo la serología ser positiva. Actualmente, se podría incluir en dicho grupo a todos los familiares en primer grado de un paciente EC, o incluso a todos los portadores del heterodímero de riesgo HLA-DQ2/8 (74), debido al riesgo aumentado que presentan para desarrollar la EC, comparado con la población general.

Atendiendo a criterios serológicos exclusivamente, que incluirían por tanto a los pacientes silentes y latentes y, en general, a todos aquellos con manifestaciones sub-clínicas, la EC afecta a uno de cada 100-400 individuos en la población general (3-5). Sin embargo se estima que únicamente están diagnosticados 1 de cada 7-10 pacientes EC (6), fracción que, en general, se corresponde con aquellos casos que presentan la forma clásica. Esto es debido a lo que se ha denominado el modelo del iceberg de la EC (6, 75, 76). Por encima de la línea de flotación del iceberg se encuentran los pacientes identificables atendiendo a la clínica clásica y con atrofia vellositaria histopatológica. Por el contrario, sumergidos por debajo de la línea de



flotación se encontrarían la mayoría de los pacientes no identificables por la sintomatología clásica, que manifestarían la enfermedad bajo formas múltiples y variadas, siendo esta fracción mucho más grande que la parte emergida (6, 75, 76). El verdadero desafío es, por tanto, caracterizar a todos los casos con EC sub-clínica (silente o latente) no diagnosticados, ya que están sometidos a un riesgo aumentado de desarrollar complicaciones clínicas que incluirían no sólo anemia y/o infertilidad, sino malignizaciones asociadas (77, 78).

### **Hipótesis metabólica como explicación a la EC.**

Tradicionalmente, se consideraba que la EC era consecuencia de una deficiencia enzimática o de cualquier otro mecanismo que actuase a lo largo de la digestión y que, en última instancia, implicaba una digestión no completa de las gliadinas en los pacientes celíacos. En este contexto, durante las últimas décadas se llevaron a cabo varios experimentos para confirmar esta hipótesis. Se observó que los homogeneizados de la mucosa del intestino delgado de los pacientes celíacos no tratados eran menos eficientes a la hora de degradar digestiones peptino-tripsínicas (PT) de gliadina que los homogeneizados de los pacientes no celíacos. Como consecuencia se propuso que esta digestión no completa de la gliadina era la desencadenante de la respuesta inmunológica, proponiéndose así la “hipótesis de la peptidasa perdida” o “hipótesis metabólica” (79).

Esta hipótesis de una digestión no completa por parte de la mucosa celíaca fue confirmada posteriormente utilizando digestiones PT tanto sobre alfa-, beta- como gamma-gliadinas (80) además de sobre otros muchos péptidos inmunodominantes (81-85). Hay que señalar que en todos estos estudios no se encontraban diferencias cualitativas en los péptidos generados entre las mucosas de pacientes EC y no-EC, y la única diferencia parecía residir en la cantidad, ya que en ambos casos se generaban los mismos péptidos aunque en diferentes cantidades. Pocos estudios encontraban que no existían diferencias, (86), observando por el contrario que los enzimas del borde en cepillo de los enterocitos de los pacientes celíacos eran igual de efectivos que los de los no celíacos a la hora de hidrolizar PT-gliadina.

Sin embargo, la hipótesis enzimática, como un posible factor contribuyente a la EC, ha quedado en la actualidad prácticamente olvidada debido a una mejor caracterización a nivel molecular de la fisiopatología, desentrañándose gran parte de

## *CAPÍTULO I*

---

### *Introducción*

los mecanismos inmunológicos implicados en la producción de la lesión histológica, así como al descubrimiento del haplotipo HLA-DQ2/DQ8 como un factor clave en la predisposición a la enfermedad.

## TEORÍA INMUNOLÓGICA DE LA EC.

### Base Genética de la EC

Actualmente se ha descifrado gran parte de la base genética de la enfermedad, presentando la EC una de las asociaciones más fuertes conocidas entre los polimorfismos HLA y el desarrollo de una patología. La base genética de la EC está ampliamente demostrada ya que mientras que la prevalencia de la EC se acerca al 1% en la población general, está aumentada al 10% entre los familiares de primer grado de un celiaco (2, 87). Además, el ambiente parece tener también un efecto en el desarrollo de la EC, ya que los gemelos dizigóticos presentan una concordancia en el desarrollo de la EC del 30%, superior al 10% esperable entre hermanos no gemelos (2, 87). El hecho de que exista una concordancia en el desarrollo de la patología entre gemelos monozigotos –con el mismo acervo genético- del 70%, sitúa en dicho porcentaje la base genética de la EC, achacándose el 30% restante a factores ambientales como podrían ser la duración de la lactancia materna(72, 73), la edad de introducción del gluten en la dieta (72, 73) o incluso la existencia de infecciones víricas y/o bacteriológicas concomitantes con la ingesta del gluten (88, 89).

La EC tiene por tanto un origen poligénico y multifactorial donde el heterodímero HLA-DQ2 (*DQB1\*02-DQA1\*0501*), y en menor medida el HLA-DQ8 (*DQB\*0302-DQA\*0301*), están presentes en la mayoría de los EC, permitiendo explicar hasta el 40% de la carga genética de la patología (2, 87). Ambos heterodímeros juega un papel central en la patogénesis de la EC al ser las moléculas encargadas de la presentación antigénica por las CPA. El heterodímero HLA-DQ2 está presente en más del 90% de los EC, pero se encuentra también entre el 20 y 30% de la población general aunque sólo el 0,5-1% de estos desarrollan la EC (2, 87). Por tanto, parece necesaria la implicación de numerosos *loci* de efecto menor, como parecen apoyar los cada vez más numerosos trabajos que identifican nuevos *loci* de susceptibilidad. Así, los genes de susceptibilidad se engloban en numerosas regiones cromosómicas, como los *clusters* *CELIAC 1*, *CELIAC 2*, *CELIAC 3* o *CELIAC 4*. Sin embargo, todos estos *loci* de susceptibilidad para tener un efecto menor que coactuaría conjuntamente con el principal factor HLA-DQ2/DQ8 (2, 87).

### **El modelo de las 2 señales:**

La teoría más aceptada hoy en día en la patogénesis de la enfermedad celiaca, es la teoría inmunológica. Tradicionalmente se consideraba a los sucesos ocurridos en la lámina propia, en el contexto de una respuesta inmunológica TH1 con predominio de IFN $\gamma$  y restricción HLA-DQ2/8, eran los únicos responsables de la respuesta. Sin embargo, en los últimos años la inmunidad innata no mediada por una presentación antigénica HLA-II y que actúa principalmente en el compartimento intraepitelial se ha desvelado como clave en el establecimiento de la patología.

Actualmente, el modelo inmunopatológico más aceptado establece que el gluten tiene un efecto doble mediado por la inmunidad innata (efecto *tóxico* directo del gluten sobre el epitelio) y la inmunidad adaptativa o específica (a través de los linfocitos T CD4+ de la lámina propia o tejido subyacente) (90).

#### REPUESTA INNATA

En el primer caso, algunos fragmentos del gluten, como el p31-49 de la  $\alpha$ -gliadina, inducen una respuesta inmunológica innata, tóxica e inmediata, no relacionada con los linfocitos T ni con la presentación antigénica HLA-DQ2/8 dependiente, mediante mecanismos aun no completamente dilucidados (91, 92). Como consecuencia se desencadena un estrés oxidativo, mediado por la formación de óxido nítrico, que proviene principalmente de la inducción de iNOS en los enterocitos (93-96) que induce la expresión en estas mismas células de ligandos como MICA (97). La gliadina también es capaz de debilitar las *tight-junctions* situadas entre los enterocitos (98, 99). Sin embargo, el principal mecanismo depende de la liberación de IL15 por parte de estos enterocitos en situación de estrés (100), que induce en los linfocitos intraepiteliales la expresión de NKG2D (101, 102) capaz de interactuar con su ligando, la molécula MICA de los enterocitos. Con ello se activan fenómenos de citotoxicidad en el epitelio que, unido al debilitamiento de las *tight-junctions*, contribuye a un aumento de la permeabilidad intestinal y el paso del gluten hasta la lámina propia, donde se desencadena la respuesta adaptativa.

#### RESPUESTA ADAPTATIVA

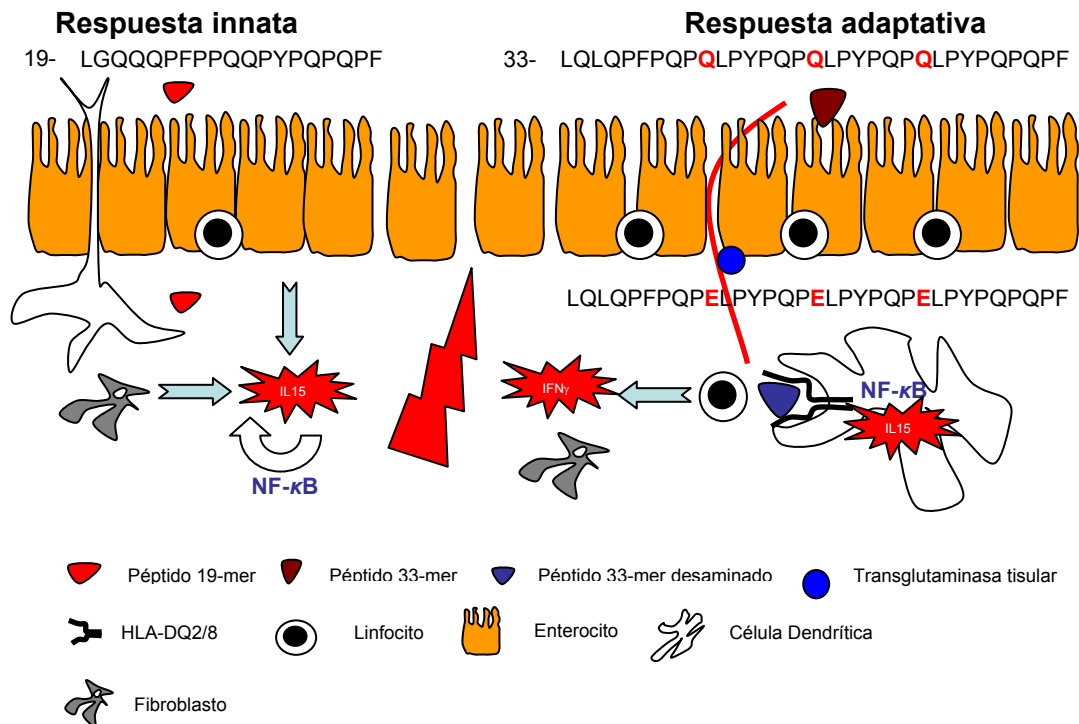
Una de las características de la inmunidad adaptativa mediada por los linfocitos T específicos es que requieren de una presentación antigénica. Esta

presentación antigénica a los linfocitos de la lámina propia debe llevarse a cabo por las CPA portadoras de elementos de restricción HLA-DQ2/DQ8. Las principales CPAs de la lámina propia son los macrófagos (20%) y sobre todo las CD (80%). Las CDs proceden en su mayoría de monocitos extravasados al ser reclutados por la mucosa inflamada, donde se diferencian *in situ* (30). Estas CPAs se encuentran incrementadas en la lesión celiaca en actividad (25% en los macrófagos y 300% en las CDs) además de expresar marcadores de activación en su superficie. Por tanto se puede asumir que en la lesión celiaca existe una acumulación de CPAs activadas, principalmente CDs. Hay que señalar que estas CDs (DQ2<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD68<sup>-</sup> CD1c<sup>-</sup> BDCA3<sup>-</sup>) juegan un papel central en la activación de los linfocitos T de memoria reactivos al gluten que se acumulan en la lesión celiaca y que son responsables en última instancia de la lesión tisular (30).

Las CPAs se encuentran a su vez activadas como consecuencia de la inducción de IL-15 derivada de la respuesta innata (103-105) ya que dicha citocina es un importante activador de las CDs para que puedan realizar su función presentadora de antígeno. Los linfocitos TCD4<sup>+</sup> de la lámina propia reconocen otros fragmentos de gluten inmunodominantes, como el péptido 33-mer (56-88  $\alpha$ -gliadina), presentados en el contexto de moléculas HLA-DQ2 o DQ8 (12, 30, 106), y tras ser modificados por el enzima TG2 (107-108). Por tanto, el efecto final estará mediado por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, responsables de una respuesta dominada por citocinas de perfil TH1, con predominio de IFN $\gamma$  y otras citocinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , , IL18...) y un descenso proporcional de citocinas reguladoras o anti-inflamatorias (IL10 y TGF $\beta$ ) (109-112). Este perfil pro-inflamatorio será el implicado en última instancia en los mecanismos de remodelación tisular. Algunos de los factores liberados al medio, son el factor de crecimiento keratinocítico (113), que podría estar implicado en la hiperplasia de las criptas típica de la EC y expresión de las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs), junto a la inhibición de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) (113), responsables de la degradación de la matriz extracelular que tiene su manifestación en el aplanamiento de las vellosidades intestinales.

En resumen, se puede afirmar que la gliadina tiene un efecto dual en el intestino de los pacientes celíacos, siendo imprescindible la activación de la respuesta inmunológica innata para que se desencadene la respuesta adaptativa en individuos susceptibles (114-119) (Figura I.2).

FIGURA I.2



### El gluten tiene un efecto dual en la mucosa del intestino delgado.

Algunos péptidos tóxicos, como el 19-mer, inducen una **respuesta inmune innata** inespecífica caracterizada por la presencia de IL-15, proveniente principalmente de los enterocitos. Dicha IL-15 activará a su vez el factor de transcripción NF-κB en las células adyacentes, lo que a su vez inducirá más producción de IL-15 así como la inducción de iNOS facilitándose un estrés oxidativo que retroalimenta la respuesta innata. Esta respuesta innata inducirá una señal de estrés en los enterocitos, quienes responderán incrementando la expresión de moléculas como MICA y/o HLA-E. Asimismo, la IL-15 inducirá un comportamiento *NK-like* en los linfocitos intraepiteliales, que responderán expresando moléculas NKG2D y NKG2C (ligandos de MICA y HLA-E respectivamente) induciéndose una apoptosis enterocitaria. Adicionalmente, la IL-15 también debilitará las *tight-junctions* entre los enterocitos que no han entrado en apoptosis.

**La respuesta adaptativa** se ve facilitada consecuencia del incremento en la permeabilidad intestinal (apoptosis enterocitaria y debilitamiento de las *tight-junctions*) ya que los péptidos inmunoadaptativos como el 33-mer pueden alcanzar la lámina propia, donde son desaminados por la enzima transglutaminasa tisular. Adicionalmente, y también de forma NF-κB dependiente, la IL-15 activará a las células dendríticas, que incrementarán en superficie la presencia de moléculas co-estimuladoras para realizar la presentación antigénica a través del HLA-DQ2/8 a los linfocitos de la lámina propia. Dicho linfocitos, realizarán una respuesta TH1, con predominio de IFN $\gamma$  y ausencia de IL-10, que inducirá a las células del estroma a secretar factores de crecimiento keratinocítico y metaloproteasas de la matriz extracelular. Adicionalmente, el perfil TH1 se encargará de magnificar la lesión además de atraer nuevas células pro-inflamatorias a la lámina propia. El efecto final será el de una linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y aplanamiento de las vellosidades, desencadenantes de todas las manifestaciones clínicas.

## **Mecanismos de inflamación en la EC**

La presencia en la lámina propia de los mediadores pro-inflamatorios no es suficiente sin embargo para la producción del daño tisular. Ninguna de las citocinas que se conocen implicadas en la EC es responsable en última instancia de los mecanismos de lesión, ya que únicamente se trata de moléculas mediadoras, sean provenientes de una respuesta inmunológica innata, adaptativa, o como parece más probable, derivado de la interacción entre ambas. La inflamación y la lesión intestinal suele ser el resultado de la interacción entre células linfoides y no-linfoides, que liberan distintos mediadores, muchos de ellos no-específicos, capaces de relacionarse y amplificar las señales que culminan en la lesión tisular de la mucosa del tracto digestivo. Los mecanismos de inflamación no específicos están mediados por una respuesta inmune innata que no requiere de presentación antigénica y en la que no están implicados los linfocitos T. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B (conjunto de 5 factores de transcripción sujetos a una estricta regulación transcripcional y traduccional) (120, 121) juega un papel principal en esta respuesta inmune. Entre los numerosos efectos del NF- $\kappa$ B, se incluye la secreción de IL-15 incluso por células no inmunes, como por ejemplo los enterocitos en el caso de la EC (100). La IL15, principal citocina de la respuesta inmune innata inespecífica, se encargará de retroalimentar positivamente la señal al inducir nueva expresión del NF- $\kappa$ B en las células adyacentes (122). Otro de los efectos de la activación del NF $\kappa$ B es la inducción del enzima iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) (91) que además de la función reguladora en el endotelio vascular y como neurotransmisor, su presencia en la lámina propia constituye un gran estrés oxidativo, que repercute en la re-inducción del NF- $\kappa$ B y el recrudecimiento de la respuesta inmune inflamatoria.

EL NF- $\kappa$ B también juega un papel clave en la conexión entre la inmunidad innata inespecífica y la inmunidad adaptativa. Las CD<sub>s</sub>, verdaderas iniciadoras de la inmunidad adaptativa, necesitan de la activación de este factor de transcripción para poder aumentar en su superficie la expresión de moléculas presentadoras (HLA-DQ2/8) y coestimuladoras (CD80/B7.1, CD86/B7.2, CD83...) lo que en definitiva hace su activación imprescindible para la presentación antigénica (103, 104, 123). Además, estas células pueden también ser activadas por las poblaciones de células de la inmunidad innata no específica, como los NK, NKT y/o los T $\gamma$  $\delta$ , y que se han activado por las señales de estrés ya comentadas (45, 55). Esto implica que las células dendríticas serían un sensor capaz de unir ambas respuestas inmunológicas,

ya que serían maduradas por las poblaciones de linfocitos innatos. Además, una vez activadas se encargaría de expandir el número y estimular la función de estos linfocitos del sistema inmune innato, los cuales son a su vez constituyen una línea de defensa vital frente a agentes infecciosos (124), y entre cuyas funciones está también una rápida producción de perforinas y granzimas (125), además de ser una fuente de IFN $\gamma$  (45) sin necesidad de que medien los linfocitos T clásicos. Finalmente, la maduración de las células dendríticas también se encargaría de inducir la respuesta inmunológica adaptativa (55) al realizar la presentación antigénica HLA-DQ2/DQ8 dependiente a las células T CD4 $^{+}$  de la lámina propia

Estos dos bucles de retroalimentación, formados por la interacción linfocitos innatos/células dendríticas y la activación del sistema NF $\kappa$ B/IL15-iNOS, contribuyen a mantener la situación de estrés en la mucosa intestinal. MICA es una molécula del MHC-I que los enterocitos expresan bajo circunstancias de estrés (102). Su ligando es la molécula NKG2D, también inducible por estrés en los linfocitos intraepiteliales y que les confiere además un comportamiento NK-*like*. Por tanto, y derivado del estrés inmunológico desencadenado, se induce una apoptosis enterocitaria dependiente de la interacción MICA/NK-G2D (101).

Finalmente, los fibroblastos del estroma, también son susceptibles a un ambiente estresante (presencia de óxido nítrico, IFN $\gamma$  y/o IL-15) (113). Consecuencia de estas señales de peligro, se induce la secreción a la lámina propia, por parte de los miofibroblastos, del factor de crecimiento queratinocítico (KGF), el cual está implicado en la hiperplasia de las criptas característica de una lesión tipo Marsh II. Por último, el ambiente estresante de la lámina propia también es responsable de aumentar la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y la síntesis de quimiocinas, que en conjunto consiguen atraer más células inflamatorias al tejido. Además, estimulan la síntesis de metaloproteinasas de matriz (MMPs) por miofibroblastos e inhibe la expresión del inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP-1). Estas MMPs son una familia de endopeptidasas activadas por Calcio y con un átomo de Zinc en su centro activo. Su principal función radica en la degradación de prácticamente todos los componentes de la matriz extracelular como proteoglicanos y glicoproteínas, y producen la destrucción de la mucosa (126), lo que implica en función de la severidad los diferentes tipos de lesión tipo III de Marsh (IIIa, IIIb, IIIc). En el intestino inflamado, se han identificado una expresión elevada de varias de estas MMPs, como MMP-1/2/3, MMP-7, MMP-9/10, MMP-12/13. La



causa última de la remodelación tisular que aparece en la EC es consecuencia tanto del incremento de actividad de estas enzimas, principalmente la MMP-12, como de la inhibición de sus reguladores (TIMP-1). De hecho, se ha descrito en la EC una correlación de estos mecanismos de inflamación inespecíficos, como son los niveles de expresión de MMP-12 como la presencia de IFN $\gamma$ , su inductor, como con el grado de daño en la mucosa, su efecto (127).

### **Más allá de la respuesta innata: Interacción IL15/IL15R $\alpha$**

Pese a que los efectos de la IL-15 se consideran tradicionalmente específicos de la inmunidad innata (128), también tiene importancia en la inducción de la inmunidad adaptativa, lo cual se hace especialmente patente en la EC, donde, además de los efectos innatos como la reprogramación NK-like de los linfocitos intraepiteliales (101, 102, 129) o la inducción de moléculas de estrés en los enterocitos (97), puede actuar también como un claro nexo de unión entre ambas respuestas inmunes al ser un potente activador de las Células Dendríticas (130-133) y con ello, de los linfocitos T CD4+. La IL-15 se convierte así en iniciador de la expansión clonal y de la respuesta inmune de tipo TH1 que acabará conduciendo a la linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y aplanamiento de las vellosidades.

Sin embargo, las particularidades de la biología de la IL-15 hacen que el estudio aislado de esta citocina no aporte suficiente luz a su función biológica. Debido al contraste entre la ampliamente extendida presencia de mRNA de IL-15 y su complejo mecanismo regulador de traducción, transporte y secreción, es imprescindible estudiar su receptor para comprender el correcto funcionamiento de esta citocina (128). Por tanto, no sólo la liberación de IL-15 sino también la biología de su ligando se convierten en poderosas armas reguladoras de esta citocina clave en la EC.

Una de las características del receptor de la IL-15 es que comparte con el de la IL-2 dos subunidades: IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma$ / $\gamma$ c (134). Además, el receptor  $\gamma$ c también es compartido con otras citocinas, como IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21, cada una de las cuales disponen de otras sub-unidades específicas responsables de la especificidad de unión y, por tanto, de la señalización posterior (135). Sin embargo, pese a esta similitud en el receptor de IL-15 e IL-2, ambas citocinas juegan papeles muy diferentes en el sistema inmune. Así, la IL-2 parece ser un modulador clave en los

procesos inmunes adaptativos dependientes de células T, mientras que la IL-15 presenta un rango de actuación mucho más amplio, aunque centrado principalmente en la respuesta innata (130). Por tanto, el papel que juegan las sub-unidades específicas del receptor, tanto la IL-15R $\alpha$  como la IL-2R $\alpha$ , parecen claves para comprender los mecanismos de actuación específicos de cada citocina ya que son las encargadas de conferir la especificidad de ligando (134, 136). De hecho, la IL-15 presenta una alta especificidad de unión al receptor IL-15R $\alpha$ , que es una proteína transmembrana tipo I (134, 136), incluso en ausencia de las subunidades IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma/\gamma_c$  (134). Niveles de mRNA de esta sub-unidad IL-15R $\alpha$  han sido detectados en una amplia variedad de sistemas celulares, tanto inmunes como no inmunes, (134, 136-140), lo que también apunta a un complejo mecanismo regulador, y a que la señalización IL-15/IL-15R $\alpha$  sea capaz de inter-relacionar diferentes sistemas celulares entre sí (128).

Por tanto, caracterizar la expresión de IL-15R $\alpha$  en el intestino, tanto de pacientes con EC como no-EC, identificar las sub-poblaciones celulares que lo expresan, cuantificar si existen diferencias cuantitativas en su expresión, y evaluar la posible existencia de diferencias funcionales, podría ser clave para comprender el nexo de unión entre la respuesta innata al gluten y la respuesta adaptativa específica observada en los pacientes con EC y que en última instancia está implicada en los fenómenos de pérdida de la tolerancia oral.

## ENFERMEDAD CELIACA REFRACTARIA.

En la actualidad, el único tratamiento para la EC es la DSG de por vida, tras la que se observa una completa remisión de la sintomatología. Sin embargo, una pequeña proporción de pacientes con EC no responden a la dieta sin gluten, lo que se denomina EC refractaria (ECR) (8). Los pacientes con ECR se caracterizan por tener una atrofia vellositaria persistente, hiperplasia de las criptas y linfocitosis intraepitelial a pesar del seguimiento de la dieta por un periodo superior a 12 meses (tras confirmar el correcto seguimiento por parte del paciente), o cuando la severidad de los síntomas persisten se necesita una intervención con independencia del periodo en dieta sin gluten (81). El origen de la ECR es aún desconocido. La principal teoría apunta a un seguimiento de la DSG incorrecto como el principal desencadenante. Los estímulos constantes de gliadina en la dieta, podrían favorecer que el infiltrado linfocitario del epitelio sufra una reprogramación *NK-like* (101), con una producción continuada de IFN $\gamma$  de forma independiente a los estímulos del TCR, que no remite. Además, puede aparecer una población de linfocitos intraepiteliales aberrantes que no expresan en su superficie el marcador general de células T (CD3), sino que está internalizado en su citoplasma. Cuando existe una expansión monoclonal de esta sub-población aberrante por encima del 20% del total de los linfocitos intraepiteliales (refractaria clase II), estos pacientes presentan numerosas infecciones recurrentes además de un alto riesgo de desarrollar un linfoma de células T asociado al intestino. Por el contrario, los pacientes con ECR o con un pequeño porcentaje o ausencia de células aberrantes y expansión no monoclonal (refractaria clase I) muestran un pronóstico mejor (8). La ECR tipo II, de peor pronóstico, se observa mayoritariamente en adultos, con una edad media entre 50 y 60 años.

La ECR, y en especial la de tipo II, es una enfermedad realmente grave, con una supervivencia a 5 años menor del 50%. La principal causa de muerte son los linfomas intestinales de células T y la persistencia de infecciones recurrentes (8). El tratamiento de la ECR generalmente implica el uso de fármacos inmunosupresores (141-143), y en el caso de la ECR tipo II quimioterapia e incluso trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (144). Sin embargo, ninguna de estas aproximaciones ha resultado ser completamente efectiva, por lo que nuevos tratamientos apoyan la recuperación de la homeostasis perdida en el sistema inmune. Recientemente, Gianfrani et al (145) han sugerido una futura aproximación

## CAPÍTULO I

---

### *Introducción*

terapéutica basada en la reintroducción de células Treg específicas de gliadina con efecto migrador (*homing*) al tubo digestivo tras su expansión *in vitro*.

## JUSTIFICACIÓN

En la enfermedad celiaca (EC), la interacción de factores ambientales y genéticos en individuos susceptibles da lugar a una respuesta inmune inadecuada frente al gluten del trigo y proteínas similares en cebada, centeno y probablemente avena (1,2). El gluten tiene un efecto dual sobre la mucosa celiaca, siendo imprescindible la activación de la respuesta inmunológica innata (efecto *tóxico* directo del gluten sobre el epitelio) para que se desencadene la respuesta adaptativa (a través de los linfocitos T CD4+ de la lámina propia) en los individuos susceptibles (114-119). Sin embargo, el papel *tóxico* directo que parece ejercer el gluten al inducir una respuesta innata inespecífica podría no estar restringido al intestino de los pacientes con EC, ya que los factores diferenciales descritos en la EC (HLA-DQ2/DQ8 y TG2) actúan en la lámina propia en el contexto de la respuesta adaptativa secundaria.

En este sentido, en esta Tesis se propone la hipótesis de que la gliadina podría ser capaz de inducir una respuesta innata mediada por IL-15 en el duodeno de todos los individuos, quedando aun por comprender por qué esta respuesta primaria desencadena la inmunidad adaptativa secundaria únicamente en los pacientes celíacos. Si esta hipótesis fuese correcta, quedaría por esclarecer en qué momento esta respuesta tóxica e inespecífica de la gliadina, y no mediada por linfocitos T, se convierte en específica en los individuos susceptibles para desencadenar la EC. Por tanto, un aspecto clave a estudiar es la identificación de factores diferenciales en la EC que permitan comprender la interacción entre la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa específica de la EC.

En esta Tesis Doctoral también se plantea caracterizar la expresión de IL-15R $\alpha$  en el intestino, tanto de pacientes con EC como no-EC, cuantificar las diferencias de expresión, y evaluar la posible existencia de diferencias funcionales que puedan conducir a un menor umbral de respuesta del intestino celiaco ante la IL-15. Se pretende también evaluar la existencia de posibles alteraciones cuantitativas y/o funcionales de las diferentes poblaciones de células homeostáticas del sistema inmune (iNKT, T $\gamma\delta$ +, Treg), tanto a nivel periférico en sangre circulante como en el propio compartimento intestinal. Adicionalmente, se estudiarán también las posibles diferencias en el procesamiento de la gliadina por la mucosa de los pacientes EC, de forma que permitan generar distintos fragmentos y, por tanto, facilitar una respuesta inmunológica diferencial. Finalmente, y dado que el NF- $\kappa$ B

parece ejercer un papel central en la inmunopatogénesis celiaca, se plantea la posibilidad de inmunomodular la respuesta a la gliadina en la mucosa duodenal celiaca mediante el bloqueo de esta vía inflamatoria.

Se pretende, en definitiva, estudiar en qué momento una respuesta inmunológica innata e inespecífica al gluten de la dieta en el intestino se convierte en una hipersensibilidad mediada por linfocitos T únicamente en la pequeña proporción de individuos que acaban desarrollando la EC.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1 Maki M, Collin P. (1997) Celiac disease. *Lancet*. Jun 14;349(9067):1755-9
- 2 Sollid LM. (2002) Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):647-55.
- 3 Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, Garcia S, Ocio G. Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol*. 2000 Apr;35(4):398-402.
- 4 Castaño L, Blarduni E, Ortiz L, Núñez J, Bilbao JR, Rica I, Martul P, Vitoria JC. Prospective population screening for celiac disease: high prevalence in the first 3 years of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004 Jul;39(1):80-4.
- 5 García Novo MD, Garfia C, Acuña Quirós MD, Asensio J, Zancada G, Barrio Gutiérrez S, Manzanares J, Solís Herruzo JA. Prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors in the autonomous community of Madrid *Rev Esp Enferm Dig*. 2007 Jun;99(6):337-42.
- 6 Catassi C, Räscht IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*. 1994 Jan 22;343(8891):200-3.
- 7 Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992 Jan;102(1):330-54.
- 8 Daum S, Cellier C, Mulder CJ. (2005) *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Jun;19(3):413-24
- 9 Al-Toma A, Verbeek WH, Mulder CJ. (2007) Update on the management of refractory coeliac disease. *J Gastrointest Liver Dis*. Mar;16(1):57-63.
- 10 Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):3-12;
- 11 Wittig BM, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis*. 2003 May;18(3):181-7.
- 12 Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):331-41.
- 13 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:232-59.
- 14 Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1406-14.
- 15 Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol*. 1998 Jun 15;160(12):5815-25.
- 16 Dippold W, Wittig B, Schwaeble W, Mayet W, Meyer zum Büschenfelde KH. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in colonic epithelial cells. *Gut*. 1993 Nov;34(11):1593-7.
- 17 Bloom S, Simmons D, Jewell DP. Adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-3 and B7 are not expressed by epithelium in normal or inflamed colon. *Clin Exp Immunol*. 1995 Jul;101(1):157-63.
- 18 Mills KHG. Regulatory T cells: friends or foe in immunity to infection?. *Nat Rev Immunol* 2004;4:841-55.
- 19 La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* 2006;27:322-7.

- 20 Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolle PA, Thomas RK, von Bergwelt-Baildon M, Debey S, Hallek M, Schultze JL. (2005) Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. Sep 15;106(6):2018-25
- 21 Thornton AM, Shevach EM. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.
- 22 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. (2001) Control of T-cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*. Aug;182:58-67.
- 23.-Kim HJ, Hwang SJ, Kim BK, Jung KC, Chung DH. NKT cells play critical roles in the induction of oral tolerance by inducing regulatory T cells producing IL-10 and transforming growth factor beta, and by clonally deleting antigen-specific T cells. *Immunology* 2006;118:101-11.
- 24 Locke NR, Stankovic S, Funda DP, Harrison LC (2006) TCR gamma delta intraepithelial lymphocytes are required for self-tolerance. *Immunol*. Jun 1;176(11):6553-9.
- 25 Thielke KH, Hoffmann-Moujahid A, Weisser C, Waldkirch E, Pabst R, Holtmeier W, Rothkotter HJ. (2003). Proliferating intestinal gamma/delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma/delta T cell pool in the peripheral blood. *Eur J Immunol*. Jun;33(6):1649-56.
- 26 Brandes M, Willmann K, Moser B. (2005) Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*. Jul 8;309(5732):264-8.
- 27 Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005 May;6(5):507-14
- 28 Niess JH, Reinecker HC. Dendritic cells: the commanders-in-chief of mucosal immune defenses. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006 Jul;22(4):354-60.
- 29 Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1373-81
- 30 Raki M, Tollefsen S, Molberg O, Lundin KE, Sollid LM, Jahnsen FL. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*. 2006 Aug;131(2):428-38.
- 31 Beacock-Sharp H, Donachie AM, Robson NC, Mowat AM. A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo. *Int Immunol*. 2003 Jun;15(6):711-20.
- 32 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
- 33 Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- 34 Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):151-61.
- 35 Palucka K, Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2002 Aug;14(4):420-31.
- 36 Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):97-130.



- 37 O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2235-46
- 38 Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 1995 May 11;375(6527):151-5.
- 39 Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation *Eur J Immunol*. 1998 Sep;28(9):2760-9.
- 40 Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb;9(1):10-6.
- 41 Molling JW, Kolgen W, van der Vliet HJ, Boomsma MF, Kruizenga H, Smorenburg CH, Molenkamp BG, Langendijk JA, Leemans CR, von Blomberg BM, Scheper RJ, van den Eertwegh AJ. (2005) Peripheral blood IFN-gamma-secreting V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer*;116:87-93.
- 42 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. (2001) Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*. Aug;182:58-67.
- 43 Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. 2000 NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*. Nov;21(11):573-83
- 44 van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM. (2001) Circulating V $\alpha$ 24+ V $\beta$ 11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol*. Aug;100(2):144-8
- 45 Yu KO, Porcelli SA. (2005) The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett*. Aug 15;100(1):42-55.
- 46 Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, Kronenberg M. (2000) Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*. Sep 4;192(5):741-54.
- 47 van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Nishi N, Kolgen W, van den Eertwegh AJ, et al. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol* 2004; 112:8-23.
- 48 Zeissig S, Kaser A, Dougan SK, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS. Role of NKT cells in the digestive system. III. Role of NKT cells in intestinal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Dec;293(6):G1101-5.
- 49 Cardell SL. (2006) The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*. Feb;143(2):194-202.
- 50 Seino K, Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J Exp Med* 2005; 202:1623-6.
- 51 Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. (1997) Requirements for CD1d recognition by human invariant V $\alpha$ 24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med*. Jul 7;186(1):109-20.
- 52 Roelofs-Haarhuis K, Wu X, Gleichmann E. Oral tolerance to nickel requires CD4+ invariant NKT cells for the infectious spread of tolerance and the induction of specific regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):1043-50.

## *CAPÍTULO I*

### *Introducción*

53 Chung Y, Chang WS, Kim S, Kang CY. NKT cell ligand alpha-galactosylceramide blocks the induction of oral tolerance by triggering dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 2004 Sep;34(9):2471-9

54 Trop S, Samsonov D, Gotsman I, Alper R, Diment J, Ilan Y. Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):746-55.

55 Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005;202:203-7.

56 Iai T, Watanabe H, Suda T, Okamoto H, Abo T, Hatakeyama K. CD161+ T (NT) cells exist predominantly in human intestinal epithelium as well as in liver. *Clin Exp Immunol*. 2002 Jul;129(1):92-8.

57 O'Keeffe J, Doherty DG, Kenna T, Sheahan K, O'Donoghue DP, Hyland JM, O'Farrelly C. Diverse populations of T cells with NK cell receptors accumulate in the human intestine in health and in colorectal cancer. *Eur J Immunol*. 2004 Aug;34(8):2110-9.

58 Eiras P, Leon F, Camarero C, Lombardia M, Roldan E, Bootello A, Roy G. Intestinal intraepithelial lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scand J Immunol*. 2000 Jul;52(1):1-6.

59 León F, Roldán E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology*. 2003 Aug;125(2):345-56.

60 *The Extant Works of Aretaeus, The Cappadocian*. By Aretaeus Edited by: Francis Adams LL.D. (trans.) Boston Milford House Inc. 1972

61 Gee S. On the coeliac disease. *St Bart Hosp Rep*. 1888;24:17-20

62 Haas SV (1924). "The value of the banana in the treatment of coeliac disease". *Am J Dis Child* 24: 421-37.

63 Dicke WK. Coeliakie: een onderzoek naar de nadelige invloed van sommige graansoorten op de lijder aan coeliakie. Tesis Doctoral, Universidad de Utrecht, Países Bajos. 1950.

64 Schapira M, Maisin JM, Ghilain JM, De Maeght S, Deltenre P, Henrion J. Epidemiology of coeliac disease. *Acta Gastroenterol Belg*. 2003 Jul-Sep;66(3):234-6.

65 Hill I, Fasano A, Schwartz R, Counts D, Glock M, Horvath K. The prevalence of celiac disease in at-risk groups of children in the United States. *J Pediatr*. 2000 Jan;136(1):86-90.

66 Cataldo F, Montalto G. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol*. 2007 Apr 21;13(15):2153-9.

67 Catassi C, Cobellis G. Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world *Dig Liver Dis*. 2007 Oct;39(10):908-10.

68 Rostami K, Malekzadeh R, Shahbazkhani B, Akbari MR, Catassi C. Coeliac disease in Middle Eastern countries: a challenge for the evolutionary history of this complex disorder? *Dig Liver Dis*. 2004 Oct;36(10):694-7.

69 Malekzadeh R, Sachdev A, Fahid Ali A. Coeliac disease in developing countries: Middle East, India and North Africa. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005 Jun;19(3):351-8.

70 Catassi C, Rättsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, Frijia M, Bearzi I, Vizzoni L. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):647-8.

71 Catassi C. El mapa mundial de la enfermedad celíaca. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2005;35:46-55

- 72 Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, Dannaeus A, Lindberg T, Lindquist B, Stenhammar L, Hernell O. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr.* 2000 Feb;89(2):165-71.
- 73 Ivarsson A, Persson LA, Hernell O. Does breast-feeding affect the risk for coeliac disease? *Adv Exp Med Biol.* 2000;478:139-49.
- 74 Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease--active, silent, latent, potential. *Gut.* 1993 Feb;34(2):150-1.
- 75 Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology.* 2001 Feb;120(3):636-51.
- 76 West J, Logan RF, Hill PG, Khaw KT. The iceberg of celiac disease: what is below the waterline? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jan;5(1):59-62.
- 77 Swinson CM, Slavin G, Coles EC, Booth CC. Coeliac disease and malignancy. *Lancet* 1983; i: 111-15.
- 78 Logan RFA, Rifkind EA, Turner ID, Ferguson A. Mortality in celiac disease. *Gastroenterology* 1989; 97: 265-71.
- 79 Carchon H, Serrus M, Eggermont E. Digestion of gliadin peptides by intestinal mucosa from control or coeliac children. *Digestion.* 1979;19(1):1-5.
- 80 Cornell HJ. Mucosal digestion studies of whole gliadin fractions in coeliac disease. *Ann Clin Biochem.* 1990 Jan;27 ( Pt 1):44-9.
- 81 Cornell HJ. Amino acid composition of peptides remaining after in vitro digestion of a gliadin sub-fraction with duodenal mucosa from patients with coeliac disease. *Clin Chim Acta.* 1988 Sep 15;176(3):279-89.
- 82 Cornell HJ, Auricchio RS, De Ritis G, De Vincenzi M, Maiuri L, Raia V, Silano V. Intestinal mucosa of celiacs in remission is unable to abolish toxicity of gliadin peptides on in vitro developing fetal rat intestine and cultured atrophic celiac mucosa. *Pediatr Res.* 1988 Aug;24(2):233-7.
- 83 Cornell HJ, Rivett DE. In vitro mucosal digestion of synthetic gliadin-derived peptides in celiac disease. *J Protein Chem.* 1995 Jul;14(5):335-9.
- 84 Cornell HJ. Partial in vitro digestion of active gliadin-related peptides in celiac disease. *J Protein Chem.* 1998 Nov;17(8):739-44.
- 85 Cornell HJ, Wills-Johnson G. Structure-activity relationships in celiac-toxic gliadin peptides. *Amino Acids.* 2001;21(3):243-53.
- 86 Bruce G, Woodley JF, Swan CH. Breakdown of gliadin peptides by intestinal brush borders from coeliac patients. *Gut.* 1984 Sep;25(9):919-24.
- 87 Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* 2003;61(2):105-17.
- 88 Handley J, O'Neill H, Connolly J, Burrows D. Adenovirus 12 and dermatitis herpetiformis. *Acta Derm Venereol.* 1993 Dec;73(6):430-2.
- 89 Lawler M, Humphries P, O'Farrelly C, Hoey H, Sheils O, Jeffers M, O'Briain DS, Kelleher D. Adenovirus 12 E1A gene detection by polymerase chain reaction in both the normal and coeliac duodenum. *Gut.* 1994 Sep;35(9):1226-32.

## *CAPÍTULO I*

### *Introducción*

---

- 90 Brandtzaeg P. (2006) The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett.* Jun 15;105(2):127-39.
- 91 Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003; 362(9377):30-7.
- 92 Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Rispo A, Griffin M, Issekutz T, Quarantino S, Londei M. Unexpected role of surface transglutaminase type II in celiac disease. *Gastroenterology.* 2005 Nov;129(5):1400-13.
- 93 Beckett CG, Dell'Olio D, Shidrawi RG, Rosen-Bronson S, Ciclitira PJ. Gluten-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine release by cultured coeliac small intestinal biopsies. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999 May;11(5):529-35.
- 94 Murray IA, Daniels I, Coupland K, Smith JA, Long RG. Increased activity and expression of iNOS in human duodenal enterocytes from patients with celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Aug;283(2):G319-26.
- 95 Daniels I, Cavill D, Murray IA, Long RG. Elevated expression of iNOS mRNA and protein in coeliac disease. *Clin Chim Acta.* 2005 Jun;356(1-2):134-42.
- 96 De Stefano D, Maiuri MC, Iovine B, Ialenti A, Bevilacqua MA, Carnuccio R. The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med.* 2006 Jan;84(1):65-74.
- 97 Martin-Pagola A, Perez-Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R, Preciado E, Castano L, Bilbao JR. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics.* 2004 Nov;56(8):549-54.
- 98 Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut.* 2003 Feb;52(2):218-23
- 99 Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett.* 2005 Aug 29;579(21):4851-5.
- 100 Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut.* 2006 Apr;55(4):469-77.
- 101 Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 2004 Sep;21:357-66.
- 102 Hùe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity.* 2004 Sep;21(3):303-4.
- 103 Yoshimura S, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. *Eur J Immunol.* 2001 Jun;31(6):1883-93.
- 104 Ouaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity.* 2002 Feb;16(2):257-70.

105 Ohteki T, Tada H, Ishida K, Sato T, Maki C, Yamada T, Hamuro J, Koyasu S. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med.* 2006 Oct 2;203(10):2329-38.

106 Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J; European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol.* 2003 Apr;64(4):469-77.

107 Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AV. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.* 2000 Mar;6(3):337-42.

108 Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 2002 Sep;123(3):803-9.

109 Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid M, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 1998 Sep;115(3):551-63.

110 León AJ, Garrote JA, Blanco-Quirós A, et al. (2006) Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol.* Dec;146(3):479-85.

111 Leon, A.J. Marcadores inflamatorios en la Enfermedad Celiaca, enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Pediatría, Inmunología, Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia. 2006.

112 Gómez E. Vías de activación intracelular de citocinas en el intestino de pacientes con Enfermedad Celiaca, enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Pediatría, Inmunología, Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia. 2007.

113 MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Pender SL. T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunol Today.* 1999 Nov;20(11):505-10.

114 Jabri B, Kasarda DD, Green PH. Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:219-31

115 Jabri B, Sollid LD Mechanism of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006 Sep;3(9):516-25

116 Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quarantino S, Maiuri L. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol.* 2005 May;42(8):913-8.

117 Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett.* 2005 Jul 15;99(2):141-5.

118 Koning F. Celiac disease: caught between a rock and a hard place. *Gastroenterology.* 2005 Oct;129(4):1294-301.

119 Koning F, Gilissen L, Wijmenga C. Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease. *Springer Semin Immunopathol.* 2005 Jun;27(2):217-32.

120 Ali S. & Mann D.A. (2004). Signal transduction via the NF- $\kappa$ B pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell biochemistry and function* 22: 67-79.

121 Bonizzi G. & Karin M. (2004) The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *TRENDS in immunology* 25: 280-288

## *CAPÍTULO I*

---

### *Introducción*

122 McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils*

123 Calder V.L.; Bondeson J.; Brennan F.M. ; Fowxell B.M.J. ; Feldmann M. (2003). Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kB

124 Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol.* 2005 Apr;79(7):4470-8.

125 van Dieren JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Escher JC, Samsom JN, Blumberg RS, Nieuwenhuis EE. (2007) Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis.* May 2; [Epub ahead of print]

126 Pender SL, MacDonald TT. Matrix metalloproteinases and the gut: new roles for old enzymes. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:546-50.

127 Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, Della Riccia DN, Bizzini F, Biagi F, Cifone MG, Corazza GR, Schuppan D. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest.* 2005 Mar;85(3):397-407.

128 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 Rev.* 2006 Aug;17(4):259-80.

129 Ebert EC. IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN-gamma and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunology.* 2005 May;115(1):118-26.

130 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. *Nat Immunol.* 2001 Dec;2(12):1138-43.

131 Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF. 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.* 2001 Aug 1;167(3):1179-87.

132 Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Suzuki T, Miyagi T, Hayashi N. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171(10):5423-9.

133 Pulendran B, Dillon S, Joseph C, Curiel T, Banchereau J, Mohamadzadeh M. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8+ Tc1 responses in vivo. *Eur J Immunol.* 2004 Jan;34(1):66-73.

134 Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 1994 Jun 15;13(12):2822-30.

135 Leonard WJ, Shores EW, Love PE. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev.* 1995 Dec;148:97-114

136 Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, Bertles J, Tometsko M, Loomis A, Giri J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem.* 1995 Dec 15;270(50):29862-9.

137 Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:19-49.

- 138 Tejman-Yarden N, Zlotnik M, Lewis E, Etzion O, Chaimovitz C, Douvdevani A. Renal cells express a functional interleukin-15 receptor. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Mar;20(3):516-23
- 139 Schluns KS, Klonowski KD, Lefrançois L. Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15Ralpha+ bone marrow-derived cells. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):988-94.
- 140 Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Krause H, Paus R, Bulfone-Paus S. Mast cells express novel functional IL-15 receptor alpha isoforms. *J Immunol*. 2003 May 15;170(10):5045-55
- 141 Goerres MS, Meijer JW, Wahab PJ, Kerckhaert JA, Groenen PJ, Van Krieken JH, Mulder CJ. (2003) Azathioprine and prednisone combination therapy in refractory coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Sep 1;18(5):487-94.
- 142 Vivas S, Ruiz de Morales JM, Ramos F, Suarez-Vilela D. (2006) Infliximab in refractory coeliac disease. *N Engl J Med*. Jun 8;354(23):2514-5.
- 143 Al-Toma A, Goerres MS, Meijer JW, von Blomberg BM, Wahab PJ, Kerckhaert JA, Mulder CJ. (2006) Cladribine therapy in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Clin Gastroenterol Hepatol*. Nov;4(11):1322-7
- 144 Al-toma A, Visser OJ, van Roessel HM, von Blomberg BM, Verbeek WH, Scholten PE, Ossenkoppele GJ, Huijgens PC, Mulder CJ. (2007) Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Blood*. Mar 1;109(5):2243-9
- 145 Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. (2006) Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*. Sep 15;177(6):4178-86.





# *CAPÍTULO II*

## *OBJETIVOS*



## Objetivos

- 1) Estudiar la respuesta inmunológica innata del intestino en los individuos con EC y no-EC frente a un estímulo de gliadina, especialmente la interacción de los mecanismos de señalización IL15/ IL15R $\alpha$  como intercomunicadores entre la inmunidad innata y la adaptativa.
- 2) Evaluar si el bloqueo del NF- $\kappa$ B, clave en la respuesta inflamatoria, podría convertirse en una nueva alternativa terapéutica a la EC.
- 3) Estudiar posibles diferencias cuantitativas en el compartimento periférico de la células homeostáticas (T $\gamma\delta$ , Treg e iNKT) de individuos EC, no-EC y pacientes con ECR, así como la posible implicación de las células iNKT intestinales (V $\alpha$ 24) en la inmunopatogénesis de la EC.
- 4) Determinar la existencia de diferencias en el procesamiento de la gliadina en la mucosa intestinal de los pacientes con EC, como un mecanismo diferencial implicado en la generación de una respuesta inmunológica al gluten.



# *CAPÍTULO III*

## *MATERIAL Y MÉTODOS*



## **SUJETOS DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Se utilizaron muestras provenientes de cuatro tipos de individuos: pacientes controles no celíacos (C), individuos celíacos en actividad (aEC), individuos celíacos tratados en dieta sin gluten (DSG), y pacientes con enfermedad celíaca refractaria (ECR). Al diagnóstico, todos los pacientes celíacos presentaban síntomas compatibles con la enfermedad, como serología (anticuerpos IgA antiendomiso y/o antitransglutaminasa) y genética positiva (HLA-DQ2/DQ8) y alteraciones histológicas en la mucosa de la biopsia duodenal. Al momento de la toma de muestra, todos los pacientes aEC presentaban alteraciones de la mucosa y serología positiva. Por el contrario, los pacientes en DSG presentaban una recuperación de la lesión histológica (Marsh 0-1), además de serología negativa desde al menos un año. Los pacientes con ECR, por el contrario, presentaban únicamente remisión de la serología, mientras que la lesión mucosa se mantuvo por un periodo superior a un año antes de realizar la toma de muestra. Las muestras biológicas utilizadas fueron de 2 tipos: muestras de sangre periférica y explantes de mucosa intestinal obtenidos por biopsia. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas en el Centro Médico de la Universidad Libre de Amsterdam (VU University Medical Center), en los Departamentos de Patología (Prof. Salvador Peña) y Gastroenterología (Prof. Chris Mulder) y en el Departamento de Pediatría del Centro Médico de la Universidad de Leiden (Dra. María Luisa Mearín). Los explantes duodenales fueron obtenidos en los Departamentos de Gastroenterología (Dres. Luis Fernández-Salazar y Benito Velayos), y de Pediatría (Dra. Carmen Calvo) del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y en el Servicio de Gastroenterología de Hospital Valle del Nalón (Dr. Sabino Riestra) de Asturias. En el caso de los pacientes control, las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de donantes voluntarios sanos sin enfermedades autoinmunes ni malignas conocidas. Las muestras de biopsia duodenal, por el contrario, se tomaron de pacientes que fueron referidos a las consultas de gastroenterología debido a otras patologías intestinales (diarrea crónica, gastritis por *Helicobacter*, hernia de hiato, etc.) En todos los casos, el diagnóstico final fue de no-EC, y en ningún caso presentaban alteraciones de la mucosa al momento de tomar la muestra.

Finalmente, se realizó también una recogida protocolizada, anónima y codificada, de los datos del paciente, demográficos, clínicos y biológicos, histopatológicos, y de tratamiento inmunosupresor (si lo hubiera).

### *CAPÍTULO III*

---

#### *Material y Métodos*

En todos los casos se obtuvo consentimiento informado de los pacientes a la toma de muestra. Los protocolos de estudio fueron aprobados por la Comisión de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y del Centro Médico de la Universidad Libre de Amsterdam. El número detallado de cada tipo de muestra y de cada grupo de paciente estudiado en cada abordaje experimental se detalla en los capítulos correspondientes.



## **PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.**

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas en tubos de heparina-litio y mantenidas a temperatura ambiente hasta su procesamiento, para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs o *peripheral blood mononuclear cells*).

### **Aislamiento y purificación de poblaciones celulares de sangre periférica**

La obtención de los linfocitos circulantes se realizó mediante el procedimiento de centrifugación en gradiente de Ficoll. Se procedió a una dilución del volumen de sangre 1:1 en solución PBS estéril. En un tubo aparte, se añadió un volumen de Ficoll igual al volumen de sangre original. Poco a poco, y sin distorsionar nunca la fase, se añadieron los 2 volúmenes de sangre-PBS sobre el volumen de Ficoll. Se centrifugó (t= 15', T ambiente, 1.800 rpm sin freno) y se recuperó cuidadosamente el halo de linfocitos en la interfase Ficoll-PBS/suero. Esto se pasó a un tubo nuevo, lavándose en PBS-1% FCS (*fetal calf serum* o suero de ternera fetal) para ayudar a preservar las proteínas de membrana. Se volvió a centrifugar (t= 15', T ambiente, 1800 rpm con freno) y se decantó el sobrenadante para resuspender los *pellets* celulares en el volumen residual. Se juntaron todos los *pellets* del mismo paciente y se volvió a lavar con PBS-1% FCS para centrifugar (t= 10', T ambiente, 1800 rpm con freno). Se resuspendieron las células en 10ml de PBS-1% FCS y se determinó el número de PBMCs obtenidos por paciente, utilizando una cámara de Neubauer con microscopio invertido agregando 1 volumen de *Trypan Blue* (2mg/ml en PBS) para determinar además la viabilidad celular.

### **Congelado y descongelado de las células**

En algunos casos se procedió a la criopreservación de los PBMCs para preservar su viabilidad hasta su utilización. Para congelar las células (nunca más de 10 millones por criovial), éstas se resuspendieron en medio volumen de RPMI-25% FCS suplementando con penicilina-estreptomicina, e incubaron durante un tiempo mínimo de 15 minutos a 4°C. Posteriormente, de forma cuidadosa, se añadió medio volumen de medio de congelación (RPMI-25% FCS-25% DMSO) gota a gota y en agitación lenta. Se recogió todo el líquido y se repartió en los crioviales (1ml/criovial), que se introdujeron rápidamente en un congelador a -20°C durante toda la noche. Al

día siguiente se guardaron en otro congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  donde permanecieron un día más hasta la criopreservación en tanques de nitrógeno líquido.

Para el descongelado celular, los crioviales necesarios se sacaron del nitrógeno líquido y se descongelaron en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$ . Cuando los crioviales estaban medio descongelados se pasaron a nuevos tubos donde gota a gota y en agitación lenta se fue añadiendo medio de cultivo. Se centrifugaron ( $t=5'$ , T ambiente, 1800 rpm con freno), se decantó el sobrenadante y el *pellet* celular se volvió a lavar con nuevo medio de cultivo y posterior centrifugación ( $t=5'$ , T ambiente, 1800 rpm con freno). Tras decantar el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en 1ml de medio de cultivo, y se determinó el número de PBMCs obtenidos por paciente en cámara de Neubauer y microscopio invertido, así como la viabilidad celular añadiendo 1 volumen de *Trypan Blue* (2mg/ml en PBS).

### **Tinción celular y análisis por citometría**

Se utilizó PBS-1% FCS como buffer de lavado, y un mínimo de 50.000 células por tinción y condición, incubándose las células con los correspondientes anticuerpos monoclonales específicos a dilución 1:10. El análisis de citometría se realizó mediante dos citómetros, Becton Dickinson FACS Calibur, y Beckman Coulter FC500. Todas las tinciones incluyeron también el control isotópico apropiado. En todos los casos, las células una vez obtenidas se lavaron dos veces con el buffer de lavado (PBS-1%FCS) (centrifugando  $t= 5'$ , T ambiente, 1800 rpm con freno), incubándose con los anticuerpos a dilución 1:10 (T  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $t= 30'$ , oscuridad). Previo al análisis de citometría, se realizaron otros dos lavados con el buffer de lavado (centrifugando  $t= 5'$ , T ambiente, 1800 rpm con freno) para eliminar los anticuerpos no unidos a las células. Las tinciones intracelulares se realizaron tras la tinción de los marcadores de superficie con el kit Cytofix/Cytoperm de Becton Dickinson. Tras eliminar los anticuerpos de superficie no unidos a las células, éstas se incubaron (T  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $t= 20'$  en oscuridad) con el buffer Cytofix/Cytoperm. Posteriormente, se lavaron con buffer Perm/Wash y se les añadieron los anticuerpos correspondientes de la tinción intracelular (diluidos 1:10) (T=  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $t= 30'$ , oscuridad). Finalmente, se realizaron otros dos lavados con el buffer Perm/Wash (centrifugando  $t= 5'$ , T ambiente, 1800 rpm con freno) antes de resuspender las células para proceder al análisis por citometría conjunto, tanto de los marcadores de superficie como intracelulares.

## **PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE BIOPSIA DUODENAL.**

Los explantes procedentes de las biopsias duodenales sufrieron un procesamiento diferencial según el estudio al que iban a ser sometidas. Algunas se embebieron inmediatamente en solución de RNALater® solution (Ambion Inc, Texas, USA) y fueron congeladas hasta su procesamiento. Otras fueron sometidas bien a un cultivo de explante completo de biopsia duodenal, o fueron utilizadas para la obtención de diferentes linajes celulares. En ambos casos, las biopsias duodenales fueron recogidas en suero fisiológico y mantenidas en frío hasta su procesamiento (llevado a cabo en el intervalo máximo de una hora).

### **Cultivos de Biopsias y ensayos de estimulación**

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

En todos los casos, el cultivo se comenzó en el plazo máximo de una hora tras la recogida de la muestra. Todos los explantes se lavaron en una solución de HBSS-Gentamicina (500 µg/ml Life Technologies-GIBCO) con el fin de eliminar la mayor parte de las bacterias Gram negativas del duodeno. El medio de cultivo estuvo constituido por RPMI 1640 (Cambrex) suplementado con un 10% de suero inactivado de ternera fetal (Cambrex), L-glutamina (2mM, Cambrex), penicilina (100 U/ml, Life Technologies-GIBCO), estreptomina (100 µg/ml, Life Technologies-GIBCO) y fungizona (0.25 µg/ml, Life Technologies-GIBCO). Cada experimento incluyó el cultivo basal de un explante en medio de cultivo, que constituyó un control interno de cada experimento. Los estímulos se realizaron suplementando el medio de cultivo con la citocina recombinante humana IL-15 (50ng/ml IL-15, R&D). De igual manera, se realizaron estímulos con 100µg/ml de una solución en etanol 70% tanto de gliadina como de zeína (ambas de Sigma), así como con los péptidos sintéticos 19- y 33-mer (ambos de Biomedal). Todos los cultivos se realizaron por inmersión en placas de cultivo, utilizando un incubador celular a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Tras 3 horas de cultivo, los explantes de biopsias, tanto en cultivo basal como estimulados, fueron lavados en HBSS-Gentamicina (500 µg/ml) y cultivados de nuevo en medio basal otras 21 horas. El objetivo fue realizar las estimulaciones en un contexto lo más fisiológico posible (3 horas), obviando una estimulación más larga que no reflejaría

los mecanismos *in vivo*, ya que se estima que el tiempo de tránsito de los antígenos de la dieta a lo largo del duodeno es de 3 horas, aproximadamente. Tras un total de 24 horas de cultivo (3 horas con estímulo + 21 horas basales), el tejido se embebió en solución RNAlater y se congeló inmediatamente hasta el momento de realizar la extracción de RNA y de proteínas.

Los sobrenadantes (SN) de cultivo fueron también congelados tanto después de un tiempo de cultivo de 3 horas (SN3), como de 24 horas (SN24), con el fin de evaluar la producción de mediadores solubles de la inmunidad.

### **Determinación de mediadores de inflamación en los sobrenadantes de cultivo**

Los sobrenadantes, tanto de cultivo basal, como los estimulados, fueron evaluados para cuantificar la liberación de diferentes mediadores pro-inflamatorios, como óxido nítrico, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12p70.

La determinación del óxido nítrico se realizó determinando la cantidad total de nitritos (metabolito primario de la oxidación espontánea del óxido nítrico) mediante la reacción de Griess (Griess Reagent kit for nitrite determination, Molecular Probes) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los SN se añadieron a placas de 96 pocillos y fondo plano, con un volumen 150  $\mu$ l, junto a 20 $\mu$ l de una solución suministrada por el kit y 130  $\mu$ l de diluyente. Se incubaron por un tiempo de 30 minutos, y se midió la absorbancia a 548nm en un lector de placas de ELISA. La concentración total de nitritos en los SN (límite de detección 1 $\mu$ M) se calculó extrapolando los resultados a una curva de concentración suministrada también por el fabricante.

Las citocinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12p70) se determinaron mediante un ensayo multiplex (Bio-Rad, Hercules, Calif) en una plataforma Luminex (Austin, Tex). Las placas con filtro se prehumedecieron, añadiéndose luego las microbolas marcadas con fluorescencia específicas para cada citocina. Tras lavar 2 veces la placa, se añadieron tanto los estándares suministrados con el kit como las muestras de estudio, en este caso los SN, y se incubaron en agitación durante 30'. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces, y se añadieron anticuerpos secundarios, incubándose en la placa durante 30' en agitación. Los anticuerpos se retiraron mediante 3 lavados, tras los que se añadió estreptavidina conjugada con PE, con incubación durante otros 10' en agitación. Finalmente, se realizaron 3 lavados antes de resuspender las microbolas y leer la placa en una plataforma

Luminex, extrapolando los resultados de intensidad de fluorescencia a las concentraciones de la curva suministrada por el kit. Los límites de detección para cada citocina se calcularon considerando 2 veces la desviación estándar obtenida sumada al blanco, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

### **Obtención de sub-poblaciones de las biopsias intestinales**

Las biopsias fueron recogidas siguiendo el protocolo de cultivo, aunque en lugar de cultivarse, éstas fueron incubadas tras el lavado con HBSS-Gentamicina (500 µg/ml), libre de Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> con dithiothreitol (DTT; Sigma Aldrich) y 1 mM de ácido etilenediaminetetraacético (EDTA; Sigma Aldrich) utilizando un agitador orbital (200rpm, t=1h, T=37°C). Tras la incubación se despegó la capa epitelial junto con los linfocitos intraepiteliales, centrifugándose (1500rpm, t=5', Tamb) y preservándose en frío hasta su uso, tras resuspender en medio de cultivo. El resto del explante de biopsia fue recuperado y transferido a un nuevo tubo donde se añadió medio de cultivo completo (descrito previamente) suplementado con colagenasa (10mg/ml, Roche) e incubado en un agitador orbital (200rpm, t= 90', T= 37°C). Tras ese tiempo, el explante sobrante se desechó y la solución fue centrifugada (1500rpm, t= 5', Tamb). El *pellet*, que contiene las células mononucleares de la lámina propia se resuspendió en medio de cultivo completo. Al final del proceso, por tanto, se obtuvieron 2 tubos por cada explante inicial, incluyendo cada uno la capa epitelial y los linfocitos intraepiteliales por una parte, y las células mononucleares de lámina propia por otra.

### **Reactivos utilizados**

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

### **ANÁLISIS MOLECULAR.**

La extracción de RNA y de las proteínas totales de los explantes de biopsias (tanto cultivadas como preservadas en RNAlater) se realizó usando Trizol® (Invitrogen–Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el tejido se disgregó en 1ml de Trizol en un homogenizador mecánico, reposando 5 minutos a Tamb. Después se añadieron 0,2 mL de cloroformo, vórtex por 2-3 minutos, y centrifugación (12.000rpm, t= 15', T= 4°C) tras la que se separaron dos fases: la inferior orgánica que contiene el DNA y las proteínas, y la superior acuosa, con el RNA.

El RNA se purificó recogiendo la fase superior, precipitándose con un volumen de isopropanol, seguido de centrifugación (12.000rpm, t= 10', T= 4°C) para descartar el sobrenadante. Sobre el precipitado se añadió 1mL de etanol 75%, vórtex, y centrifugación (7.500rpm, t= 5', T= 4°C) para descartar el sobrenadante. Tras secar el etanol, el RNA se resuspendió en agua libre de RNAasas.

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

### **PCR cuantitativa**

En todos los casos, la cuantificación del mRNA se realizó por PCR de retrotranscripción (RT-PCR) para obtener cDNA y PCR cuantitativa (qPCR) con el fin de evaluar la cantidad parcial de cDNA bajo estudio en el total. Tanto en los RNAs obtenidos tras el cultivo de biopsias, como en los RNAs de biopsias no cultivadas procedentes de nuestra RNAteca y mantenidas en RNAlater, la RT-PCR se realizó usando el kit SuperScript® First-Strand Synthesis System for reverse Transcriptase (RT)-PCR Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA) con primers oligo dT. En todos los casos se utilizó una recta de calibración para cada producto construida con

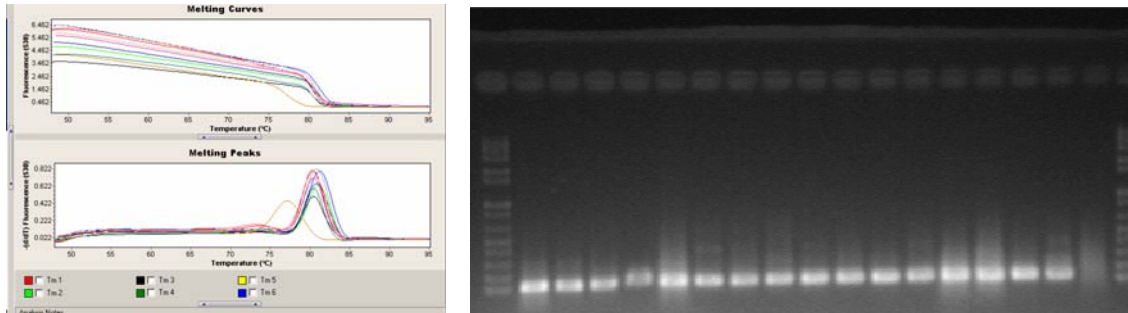
diluciones seriadas de cDNA de líneas celulares estimuladas que expresaban la molécula bajo estudio, usándose el gen  $\beta$ -actina como gen *housekeeping* para normalizar las diferentes cantidades de RNA entre las muestras. Para la qPCR a tiempo real se utilizó un LightCycler® instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Las reacciones se realizaron con FastStart SYBR Green MasterMix (Roche) añadiendo Uracil DNA glycosilasa (UDG) (Roche) para prevenir contaminaciones cruzadas en qPCRs de diferentes muestras. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias del ratio molécula/ $\beta$ -actina. Todas las moléculas que no presentaron niveles detectables de expresión tuvieron asignado un valor arbitrario de 0.1 Las secuencias de los *primers* usados, así como la longitud en pares de bases del amplificado, tiempo de *annealing* y referencia de los *primers* se especifican en la tabla III.1

La especificidad de todos los *primers* usados fue evaluada por partida doble. En primer lugar, antes de encargarse los *primers* (MWG biotech, Alemania), se obtuvo la secuencia del cDNA de todas las isoformas descritas de cada molécula desde el Genbank y se alineó con la secuencia de *primers* seleccionados mediante el software Bioedit (1) para comprobar la especificidad de los *primers*. En todos aquellos casos en los que la molécula a estudio presentaba varias isoformas alternativas, se seleccionaron aquellos *primers* que o bien amplificaban por igual y con el mismo tamaño todas las isoformas (como fue el caso de la molécula FoxP3), o por el contrario únicamente amplificaban aquellas isoformas interesantes para nuestro estudio, como en el caso de IL15R $\alpha$  donde únicamente se estudiaron las isoformas no secretadas. Secundariamente, y una vez hecha la PCR, la especificidad de la amplificación fue estudiada tanto mediante la evaluación de los picos de *melting* (Figura III.1a) como confirmando el tamaño molecular, en pares de bases, de los productos generados (Figura III.1b).

Figura III.1

a)

b)



Ejemplo de optimización de la técnica qPCR para el estudio de la expresión duodenal de la molécula Vα24. Tras el diseño de los *primers*, la especificidad de la amplificación fue tomada en cuenta a) tanto considerando la existencia de picos únicos de *melting* (únicamente no presentan pico las muestras no amplificadas, en este caso el blanco de la PCR) como b) confirmando el peso molecular de los amplificadores (en este caso 105 pares de bases).

Tabla III.1

Molécula	Secuencia de los <i>primers</i>	bp	T <i>annealing</i>	Referencia
β-actina	fw: 5' - ATG GGT CAG AAG GAT TCC TAT GTG - 3' rv: 5' - CTT CAT GAG GTA GTC AGT CAG GTC - 3'	359	60	2
IL15Rα	fw: 5' - GCC AGC GCC ACC CTC CAC AGT AA - 3' rv: 5' - GCC AGC GGG GGA GTT TGC CTT GAC - 3'	402	70	3
iNOS	fw: 5' - TCT GCA GAC ACG TGC GTT ACT - 3' rv: 5' - ATG CAC AGC TGA GCA TTC CA - 3'	115	56	4
IFNγ	fw: 5' - TGG AAA GAG GAG AGT GAC AG - 3' rv: 5' - ATT CAT GTC TTC CTT GAT GG - 3'	129	60	5
TNFα	fw: 5' - TCA GAT CAT CTT CTC GAA CC - 3' rv: 5' - CAG ATA GAT GGG CTC ATA CC - 3'	361	60	6
STAT1	fw: 5' - CCA TCC TTT GGT ACA ACA TGC - 3' rv: 5' - TGC ACA TGG TGG AGT CAG G - 3'	71	56	7
STAT3	fw: 5' - GCC AGA GAG CCA GGA GCA - 3' rv: 5' - ACA CAG ATA AAC TTG GTC TTC AGG TAT G - 3'	75	62	8
IL-23 (p19)	fw: 5' -AGC AGC TCA AGG ATG GCA CTC AG -3' rv: 5' - CCC CAA ATT TCC CTT CCC ATC TA -3'	206	60	9
IL-27 (p28)	fw: 5' - GCG GAA TCT CAC CTG CCA - 3' rv: 5' - GGA AAC ATC AGG GAG CTG CTC - 3'	69	64	10
IL-12 (P35)	fw: 5' - TGT CAC CGA GAA GCT GAT GT -3' rv: 5' - GAG GTT TCT GGC CAA ACT GA -3'	278	68	11
Vα24	fw: 5' - CTG GAG GGA AAG AAC TGC -3' rv: 5' - TGT CAG GGA AAC AGG ACC -3'_	105	65	12
FoxP3	fw: 5' - CAG CAC ATT CCC AGA GTT CCT C -3' rv: 5' GCG TGT GAA CCA GTG GTA GAT C -3'	154	60	13

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



### **Western-Blot**

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

### **Zimografía**

Los estudios de actividad proteasa se realizaron cargando 8 µg de proteína total por pocillo de un gel de zimografía en un soporte mini-Protean II (Biorad). Los geles de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) al 15% se encontraban suplementados con un 0,1% de la proteína a estudio (gliadina o gelatina, ambas de Sigma), quedando dichas proteínas inmovilizadas entre los polímeros de acrilamida/bisacrilamida y por tanto no sujetas a la electroforesis. Con el fin de no desnaturalizar de forma irreversible las proteínas a estudio, ni las muestras fueron desnaturalizadas por calor, ni el buffer de carga de las proteínas llevaba DTT, por oposición al utilizado en el Western-blot. Al final de la separación electroforética, los geles fueron lavados 2 veces (t= 15' cada lavado) con Tritón-X-100 al 2,5% para eliminar el SDS del gel y permitir que las proteínas pudiesen recuperar su estructura tridimensional original. Los geles, fueron incubados toda la noche con buffer de incubación (50mM Tris, p<sup>H</sup> 7.5, 5mM CaCl<sub>2</sub>) para conferir un sustrato biológico a las proteínas separadas por peso molecular. La actividad proteasa (gliadinasa o gelatinasa) fue revelada mediante tinción de azul de Coomassie (0,1% de colorante diluído en una mezcla de acético:metanol:agua (1:3:6) y diluciones posteriores en

mezcla decolorante (misma mezcla aunque sin colorante). Como consecuencia, todo el gel se reveló completamente teñido (debido a las proteínas de la matriz) salvo aquellos lugares donde había proteasa específica de la proteína de la matriz, que se revelaban como ausencia de tinción. A lo largo de todo el proceso se mantuvo el *stacking* gel (gel concentrador) como control interno del experimento, ya que no iba suplementando con proteína en su matriz y, por tanto, se revelaba como no teñido.

### **Estudios de inmunofluorescencia**

La expresión del receptor de la IL-15 en cortes histológicos de muestras duodenales fue estudiada mediante microscopía confocal. Los explantes duodenales fueron fijados en medio de Browin y embebidos en parafina. Una vez obtenidos los cortes, las secciones fueron incubadas con 50µg/ml de anticuerpo de cabra anti-IL15Rα humana (R&D). Secundariamente, se incubó con anticuerpos de burro anti-IgG de cabra marcados con Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratorios), a una dilución final de 1:200. Los análisis de microscopía confocal fueron realizadas en un microscopio LSM 510 meta Zeiss usando el software LSA 5 v 3.2

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- 1 Hall, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. 1999 Ser. 41:95-98.
- 2 Bongers M, Liehl E, Barsig J (2002) One-Step RT-PCR to Detect Cytokine/Chemokine Induction in Macrophages. Focus. 21 (3): 66-68
- 3 Tejman-Yarden N, Zlotnik M, Lewis E, et al. (2005) Renal cells express a functional interleukin-15 receptor. Nephrol Dial Transplant. Mar;20(3):516-23.
- 4 Ohtsuki M, Nomura T, Morimoto S, et al. (2005) Suppressed expression of GTP cyclohydrolase I mRNA and accelerated expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in endomyocardial biopsy specimens from patients with dilated cardiomyopathy. Clin Chim Acta. Mar;353(1-2):103-7.
- 5 Karlsson MG, Ludvigsson J. (1998) Determination of ARNm expression for IFN $\gamma$  and IL-4 in lymphocytes from children with IDDM by RT-PCR technique. Diabetes Res Clin Pract Apr;40:21-30.
- 6 Atkins GJ, Haynes DR, Geary SM, et al.(2000) Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. Bone Jun;26:653-61.
- 7 Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. Cancer Res. 2001 May 15;61(10):3869-76.
- 8 Gómez E. Vías de activación intracelular de citocinas en el intestino de pacientes con Enfermedad Celiaca, enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Pediatría, Inmunología, Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia. 2007.
- 9 Wesa A, Galy A. Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand. BMC Immunol 2002 Oct 18;3:14.
- 10 Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. Immunity. 2002 Jun;16(6):779-90.
- 11 Leon AJ. Marcadores inflamatorios en la Enfermedad Celiaca, Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Pediatría, Inmunología, Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia 2006
- 12 Grose RH, Thompson FM, Baxter AG, Pellicci DG, Cummins AG. Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 2007 Jun;52(6):1415-22.
- 13 Roberts T, Beyers N, Aguirre A, Walzl G. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- $\gamma$  production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- $\beta$ , and interleukin-4 mRNA levels. J Infect Dis. 2007 Mar 15;195(6):870-8.



# *CAPÍTULO IV*

## *¿REALMENTE LA GLIADINA ES INOCUA PARA LOS NO CELIACOS?*

*Manuscrito parcialmente publicado:*

Bernardo D, Garrote JA, Fernández-Salazar L, Riestra S, Arranz E (2007) Is gliadin really safe for non-celiac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-celiac individuals challenged with gliadin peptides. Gut. Jun;56(6):889-90



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC), es una hipersensibilidad tipo IV del intestino delgado frente al trigo y otros cereales que contienen gluten (cebada, centeno y probablemente avena) en individuos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8). Su único tratamiento es la dieta sin gluten (DSG) de por vida (1,2).

Actualmente, se asume el modelo de las 2 señales como el más probable para explicar la inmunopatogénesis de la EC (3). En dicho modelo, la inmunidad innata juega un papel clave en el desarrollo de la EC. Esta respuesta está mediada principalmente por la IL-15, y es desencadenada por “péptidos tóxicos” derivados de la gliadina, como el 19-mer, a través de un mecanismo DQ2-independiente (4, 5). En consecuencia, se induce un estrés epitelial caracterizado por aumento de la expresión de MICA en los enterocitos (6), además la una reprogramación *NK-like* en los linfocitos intraepiteliales, lo que desencadena una apoptosis de los enterocitos dependiente de MICA-NGK2D (7), y con ella un aumento de la permeabilidad intestinal. De esta forma los péptidos inmunodominantes, como el 33-mer (8), pueden alcanzar la lámina propia más fácilmente. Allí sufrirán la desaminación por parte de la transglutaminasas tisular (TG2) (9, 10, 11), proceso que aumenta su afinidad por la molécula HLA-DQ2/DQ8 y por tanto podrán ser presentados en su contexto (12) por las células dendríticas (CDs) (13, 14), previamente activadas por efecto de la IL-15 (15, 16, 17, 18) y activar así una respuesta adaptativa caracterizada por un perfil TH1 de citocinas con predominio de IFN $\gamma$  (19, 20, 21).

Pese a que se ha descrito que la respuesta innata y, por tanto, la producción de IL-15, es específica de los pacientes EC (4), no se han descrito factores diferenciales que controlen la respuesta innata en los pacientes EC. De hecho, los 2 factores diferenciales descritos en la EC mejor conocidos, HLA-DQ2/DQ8 y TG2, actúan en la lámina propia en el contexto de la respuesta adaptativa. Por tanto, se podría decir que la respuesta innata debería ser observada por igual tanto en individuos EC como no-EC. Es más, en la actualidad disponemos de abundante información que apunta a un efecto tóxico directo por parte de la gliadina en varios modelos biológicos. Así, se ha descrito como la gliadina es capaz de inducir reordenaciones del citoesqueleto que afectan a la integridad de las *tight-junctions* entre los enterocitos a través de un mecanismo dependiente de zonulina, no sólo en líneas celulares epiteliales, como las células Caco-2 (22, 23), IEC-6 (24, 25) o el sistema multicelular LoVo (26), sino también en explantes duodenales de pacientes

no-EC estimulados *in vitro* con gliadina (25). Además la gliadina es un potente estímulo para las células presentadoras de antígeno, como los monocitos, macrófagos, e incluso células dendríticas, tanto humanas como murinas (27, 28, 29, 30). La gliadina es también capaz de ejercer un efecto citotóxico directo en varias líneas celulares humanas, donde puede inhibir el crecimiento celular y reducir la viabilidad celular (31, 32, 33, 34). Finalmente, en la línea celular Caco-2, la gliadina no sólo es capaz de inhibir la síntesis tanto de DNA como de RNA (35, 36), sino también de inducir apoptosis (37, 38).

Por tanto, dado que el efecto tóxico directo de algunos fragmentos de la gliadina a través de un mecanismo HLA-DQ2/DQ8 independiente parece demostrado, en este capítulo planteamos la posibilidad de que la gliadina sea un desencadenante de la inmunidad innata en el intestino de todos los individuos, tanto EC como no-EC, mientras que la inmunidad adaptativa secundaria, verdadera efectora de la EC, se disparará únicamente en los individuos EC. Para sopesar dicha hipótesis se han realizado cultivos de explantes duodenales de pacientes controles no-EC y de pacientes EC en DSG, y se han estimulado con una solución de gliadina y con los péptidos sintéticos 19- y 33-mer libres de LPS. Los datos obtenidos podrían confirmar que, tanto la gliadina como sus péptidos derivados, son potentes inductores de la inmunidad innata en todos los individuos.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Sujetos de estudio**

Se han obtenido explantes duodenales de un total de 10 pacientes EC tratados en DSG y 22 individuos controles no-EC sin alteraciones duodenales al momento de la biopsia. Todos los pacientes fueron recogidos en los Servicios de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y del Hospital Valle del Nalón de Asturias.

### **Cultivo de biopsia y obtención de sub-poblaciones linfocitarias**

Los explantes provenientes de 16 individuos controles sanos no-EC y 4 pacientes EC tratados en DSG fueron cultivados junto a una solución de gliadina (100µg/ml). En algunos casos, además de la solución de gliadina se co-estimuló con una solución bloqueante de anticuerpo anti-IL15 humana (R&D, 5µg/ml). Todos los cultivos incluyeron un explante cultivado en condiciones basales o con la adición de una solución de zeína (100µg/ml) tras comprobar que no inducía respuesta, constituyendo estos cultivos un control interno de cada individuo. Los cultivos se realizaron por un tiempo de 3 horas, tras el que los explantes fueron lavados en HBSS-Gentamicina (500 µg/ml); y procesados para la obtención de poblaciones linfocitarias del epitelio (linfocitos intraepiteliales, LIEs) y de lámina propia (LLP) tras procesamiento con solución de DTT-EDTA y digestión con colagenasa, tal como se describió en la sección de material y métodos.

### **Análisis por Citometría**

Una vez obtenidas las poblaciones de LIEs y LLP de los explantes cultivados por 3 horas en diferentes condiciones, las células fueron caracterizadas por citometría de flujo en un citómetro FC500 (Beckman Coulter). Las células se marcaron con CD45 (PE-marcado, BD Biosciences), CD103 (FITC-marcado, BD Biosciences), CD25 (APC-marcado, BD Biosciences), CD45RO (PE-marcado, BD Biosciences), CD69 (FITC-marcado, BD Biosciences), CD30 (FITC-marcado, BD Biosciences) y CD3 (APC-marcado, BD Biosciences). En todos los casos se usaron los controles de isotipo apropiados.

### **Cultivo de biopsia y análisis molecular**

Muestras provenientes de 6 pacientes controles no-EC y de 6 pacientes EC en DSG fueron estimulados con la adición de una solución de gliadina (100µg/ml) (6 pacientes EC en DSG y 6 pacientes controles no-EC) y con los péptidos sintéticos libres de LPS 19- y 33-mer (100µg/ml) (6 pacientes controles no-EC con cada péptido). Los cultivos se realizaron por un tiempo de 3 horas, y los explantes fueron lavados después en HBSS-Gentamicina (500 µg/ml) para ser transferidos a un nuevo medio de cultivo por otras 21 horas, con el fin de determinar si el estímulo innato iba seguido de una respuesta inmune secundaria. Cada estímulo incluyó un cultivo basal que constituyó un control interno. Tras 24 horas de cultivo (3 horas de estímulo + 21 horas basal), los explantes fueron embebidos en RNA later y congelados inmediatamente. Las proteínas totales y el RNA fueron extraídos según el procedimiento de TRIZOL®. El cDNA fue obtenido con el kit SuperScript® First-Strand Synthesis System for reverse Transcriptase (RT)-PCR.

### **Estudios de PCR cuantitativa y determinación de nitritos**

Se determinaron los niveles de mRNA de STAT1, STAT3, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-23 (p19), IL-27 (p28), IL-12 (p35) y  $\beta$ -actina (utilizado como gen *house keeping*) en los explantes cultivados durante 24 horas (3horas estímulo + 21horas en medio basal) y preservados en RNAlater. Las secuencias de los primers utilizados, así como sus condiciones de PCR están descritos en la tabla III.1. Se les asignó un valor arbitrario de 0,1 a todas las moléculas que no presentaron niveles detectables de expresión. La determinación de óxido nítrico en los sobrenadantes a las 3 horas de cultivo fue realizada según la reacción de Griess para determinación de nitritos.

### **Western-blot de IL-15**

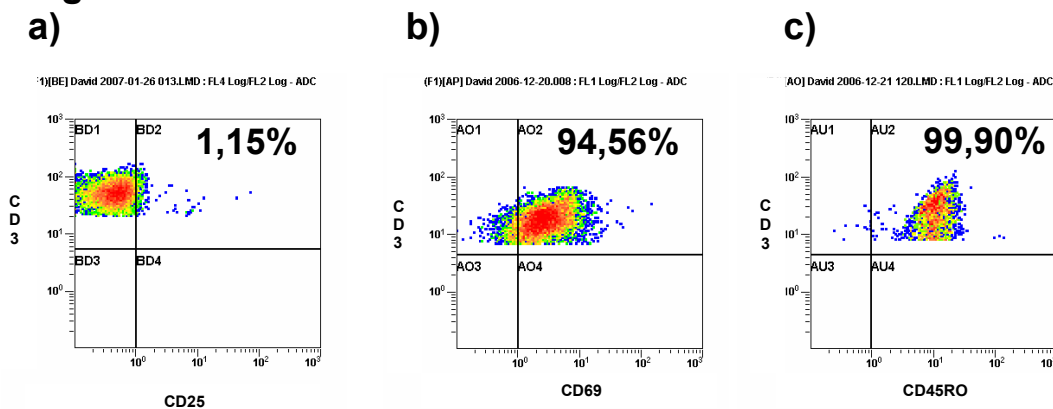
Se cargaron en total 8µg de proteínas de los extractos completos de biopsia intestinal cultivados en medio basal y tras estimulación con solución de gliadina (6 pacientes EC en DSG y 3 pacientes controles no-EC); y con los péptidos sintéticos 19- y 33-mer (6 pacientes controles no-EC). Como control positivo se usó IL-15 recombinante humana (Preprotech, USA).

## RESULTADOS

### Moléculas de activación en poblaciones linfocitarias intestinales

En torno al 5-10% del total de células obtenidas en los compartimentos intraepitelial y de la lámina propia eran linfocitos, caracterizados por la expresión de CD45 y CD3. Además, más del 95% de estas células co-expresaban el marcador de migración intestinal CD103 ( $\alpha 4\beta 7$ ), lo que confirmaba la naturaleza de las poblaciones linfocitarias. Menos del 2% del total de las células de ambos compartimentos expresaban el receptor de la IL-2 (CD25) (Figura IV.1). Por el contrario, más del 95% de los linfocitos obtenidos en ambos compartimentos expresaban un fenotipo de memoria (CD45RO) conjuntamente con el marcador de activación temprano CD69 (Figura IV.1). La incubación con solución de zeína no modificó en ningún caso la expresión de estos 3 marcadores. Además, la expresión de estos 3 marcadores se mantuvo inalterada tras la estimulación previa de los explantes con una solución de gliadina (tanto en pacientes controles como en pacientes EC), por lo que fueron desechados como marcadores útiles de activación en este abordaje experimental.

**Figura IV.1**



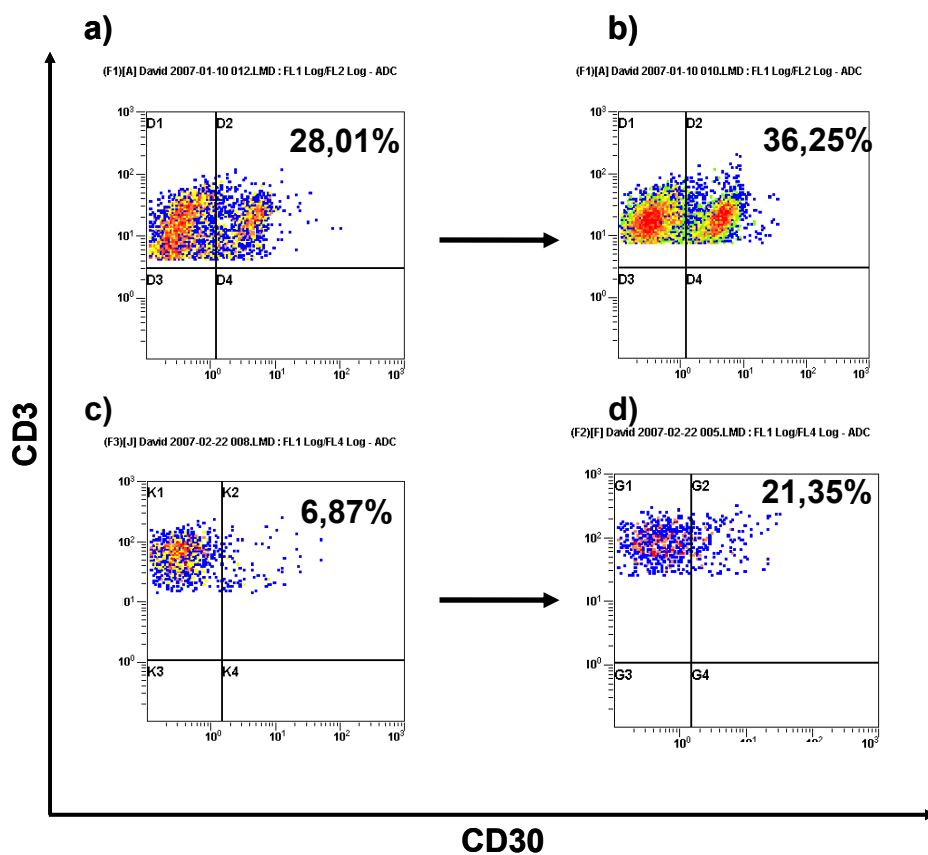
Expresión de los marcadores de activación CD25 (a), CD69 (b) y CD45RO (c) en el compartimento de la lámina propia de un individuo control no-EC representativo de varios experimentos independientes. Los resultados obtenidos en el compartimento intraepitelial mostraron el mismo patrón de expresión masiva de los marcadores CD69 y CD45RO y ausencia de expresión de CD69. El análisis se realizó dentro de la población CD3.

### CD30 es un marcador de activación intestinal en respuesta a gliadina mediado por IL-15

CD30 es una proteína transmembrana tipo I, miembro de la familia de receptores del TNF. Es un marcador de activación temprana, tanto de la respuesta innata como de la respuesta adaptativa, exclusivamente en células CD45RO+. Dado que más del 95% de los linfocitos intestinales co-expresan CD45RO+, y además es

una molécula inducible por IL-15 (39), que es mediadora de la respuesta a la gliadina en los pacientes EC, CD30 se convierte en una potencial molécula de respuesta ante un estímulo de gliadina. Se encontraron niveles basales de expresión en los pacientes controles no-EC tanto en el compartimento intraepitelial (6,48-18% del total de CD3) como de la lámina propia (12-28,01% del total de CD3) tras cultivo basal y/o tras estimulación con zeína por 3 horas, que no afectó la expresión de CD30. Es interesante señalar que el estímulo con gliadina indujo un aumento de expresión de CD30 en el compartimento de lámina propia (Figura IV.2).

**Figura IV.2**

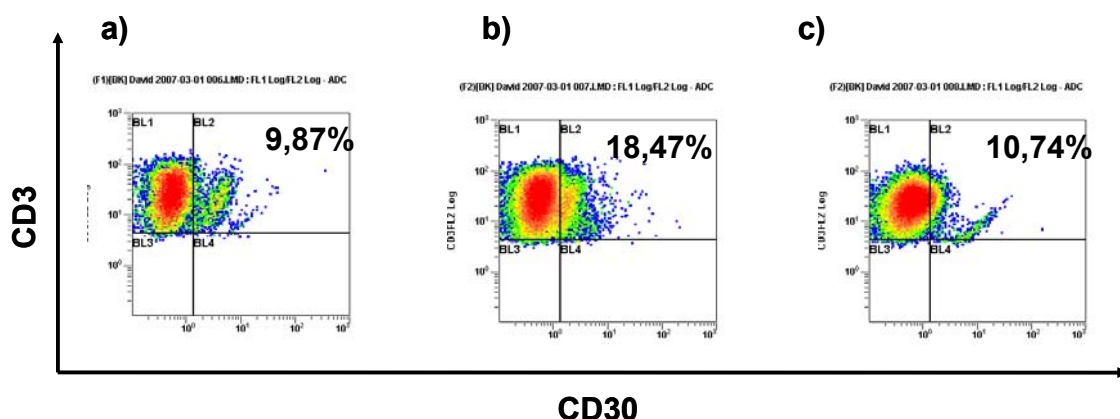


Expresión del marcador de activación CD30, en el compartimento de la lámina propia de explantes duodenales de un paciente EC tratado en DSG (a y b) y de un paciente control no-EC (c y d) representativo de varios experimentos independientes. Los explantes duodenales, antes de la obtención de los linfocitos de lámina propia, habían sido cultivados previamente en presencia de una solución de zeína (t= 3h, 100µg/ml) (a y c) o de gliadina (t)3h, 100µg/ml) (b y d). En ambos grupos de pacientes (2 EC en DSG y 4 controles no-EC) la estimulación con gliadina indujo la expresión de CD30

Dicho incremento de expresión de CD30 fue detectado tanto en pacientes EC tratados con DSG (2 pacientes) como en individuos control no-EC (4 individuos). Sin

embargo, la expresión de CD30 no se modificó en ningún caso en el compartimento intraepitelial. Hay que señalar que cuando el estímulo con gliadina se realizaba conjuntamente con la adición de anticuerpo bloqueante anti-IL15 en los pacientes controles no-EC, el incremento de expresión de la molécula CD30 quedaba inhibido (Figura IV.3).

**Figura IV.3**



Inhibición del incremento de expresión de CD30 en el compartimento de la lámina propia de un paciente control no-EC tras incubar con solución de anticuerpo bloqueante anti-IL15 representativo de varios experimentos independientes. Previo a la obtención de los linfocitos de lámina propia, los explantes duodenales se cultivaron por 3 horas en medio suplementado con anti-IL-15 bloqueante (5µg/ml) (a), con solución de gliadina (100µg/ml), o con solución de gliadina conjuntamente con anticuerpo bloqueante (c). El

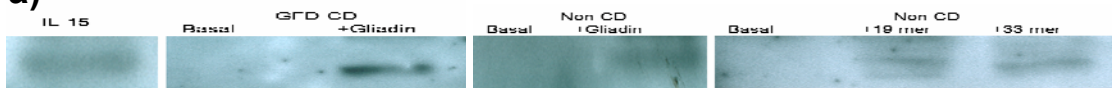
### La gliadina es un inductor de IL-15

El hecho de que la inducción de CD30 quede bloqueada en presencia de anticuerpos anti-IL15 parece confirmar que el efecto estimulador de la inmunidad innata inducida por la gliadina en el duodeno de todos los individuos está mediado por la IL-15. Si tal fuese el caso, la inducción de IL-15 en los explantes de los pacientes control no-EC debería poder revelarse mediante la técnica de Western-blot. Los resultados obtenidos muestran que tanto en los pacientes EC en DSG (5 de 6) como en los controles no-EC (6 de 6) se observa la expresión de IL-15 (determinada por Western-blot) tras el estímulo con una solución de gliadina (Figura IV.4), comparado frente al cultivo basal. Dado que la solución de gliadina había sido previamente analizada para descartar la existencia de LPS contaminante, este no parecía ser la causa de la inducción de la IL-15. Además, los cultivos fueron repetidos en 6 pacientes controles no-EC estimulados con los péptidos sintéticos libres de LPS 19- y 33-mer (Figura IV.4). Los resultados obtenidos confirmaron los anteriores, ya que el péptido tóxico 19-mer indujo la expresión de IL-15 en 3 de los 6 pacientes control no-EC, mientras que el péptido inmunodominante 33-mer indujo

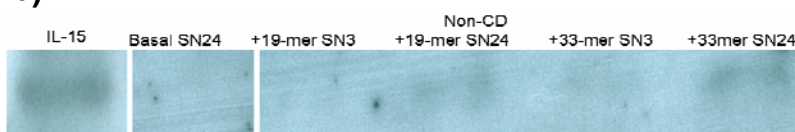
dicho expresión 5 de los 6 de los casos. Hay que señalar que en ningún caso se detectó expresión basal de IL-15 en los controles no-EC. Además, y pese a que no era esperable, el péptido 33-mer se reveló como un potente inductor de la IL-15, más aún que el tóxico 19-mer.

**Figura IV.4**

**a)**



**b)**



Western-blots de IL-15 representativos de varios experimentos independientes. a) sobre el extracto proteico total de los explantes duodenales en un paciente EC en DSG estimulado con solución de gliadina, referido al cultivo basal, y 2 pacientes control no-EC estimulados con solución de gliadina y con los péptidos sintéticos libres de LPS 19- y 33-mer, también comparados frente al cultivo basal. Ninguno de los cultivos basales expresa dicha citocina. b) sobrenadantes de cultivo en medio basal a las 24 horas de un paciente control no-EC y sobrenadantes a las 3 y 24 horas, del mismo paciente, tras el estímulo previo con los péptidos 19- y 33-mer. Todos los estímulos se realizaron utilizando 100µg/ml, t=3h, y posterior cultivo en medio basal por otras 21 horas. IL-15: control positivo; GFD-CD; paciente EC tratado en DSG; Non-CD: paciente control no-EC; SN: sobrenadante del cultivo.

Finalmente se decidió estudiar la presencia de IL-15 en los sobrenadantes de los cultivos (1 paciente EC en DSG y 3 pacientes controles no-EC), para descartar que la IL-15 inducida se mantenía en el compartimento celular y no era secretada en los pacientes controles no-EC. Se detectó IL-15 en los sobrenadantes de todos los cultivos evaluados, tanto en los del EC en DSG como en los pacientes control no-EC tras el estímulo con las soluciones de gliadina y/o de los péptidos sintéticos 19- y 33-mer (Figura IV.4b). Esta detección de IL-15 en el sobrenadante de todos los cultivos, conjuntamente con el incremento de la expresión del marcador de activación linfocitaria CD30 tanto en los pacientes EC como en los controles no-EC, parece confirmar por tanto que la gliadina es realmente un activador inespecífico de la inmunidad innata.

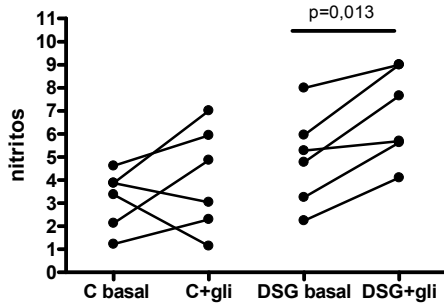
### Los mediadores adaptativos están alterados únicamente en los pacientes EC

Por último decidimos estudiar como se modificaba la expresión de diferentes moléculas que se conoce están implicadas en la respuesta inmunológica al gluten

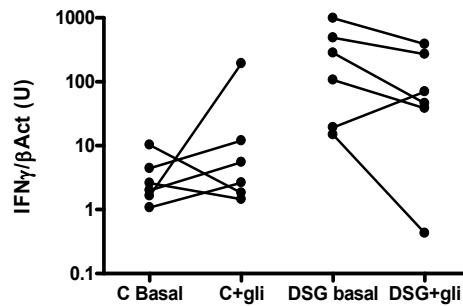
observada en los pacientes EC y que han sido ampliamente estudiadas en nuestro laboratorio (40, 41). Se estudiaron así varios puntos de conexión entre la inmunidad innata con la adaptativa, como son diferentes factores de transcripción y citocinas TH1, tanto en los pacientes controles no-EC como en los EC en DSG tras el estímulo de los explantes duodenales con una solución de gliadina. Se obvió el estudio de respuesta a los péptidos aislados 19- y/o 33-mer a favor de una solución de gliadina, para conferir al cultivo de la presencia conjunta de todos los péptidos necesarios, tanto activadores de la inmunidad innata como desencadenantes de la inmunidad adaptativa. La inducción de óxido nítrico, determinado como producción de nitritos, únicamente resultó estadísticamente significativa en el caso de los pacientes EC en DSG tras el estímulo de gliadina, mientras que los niveles no variaron en los individuos control no-EC (Figura IV.5). Estos datos, parecen indicar que la IL-15 inducida en los pacientes EC es más efectiva a la hora de desencadenar la producción de óxido nítrico en los pacientes EC. Por el contrario, ninguna de las citocinas estudiadas: TNF $\alpha$ , IL12-p35, IL23-p19 ni IL27-p28 modificaron su expresión de mRNA tras el estímulo con gliadina, ni en los pacientes EC ni en los individuos control no-EC. Tampoco se encontraron diferencias de expresión en los cultivos basales entre ambos grupos de pacientes. Sin embargo, y aunque no era estadísticamente significativo, los niveles de expresión de las moléculas STAT1, STAT3 e IFN $\gamma$  presentaron cierta tendencia a modificar su expresión en los pacientes EC tras el estímulo de gliadina (test Wilcoxon pareado: p= 0,1250; p= 0,0938; p= 0,0938 respectivamente), mientras que apenas variaban en los pacientes controles no-EC (test Wilcoxon pareado: p= 0,4375; p= 0,6875; p= 0,4375 respectivamente) (Figura IV.5).

Figura IV.5

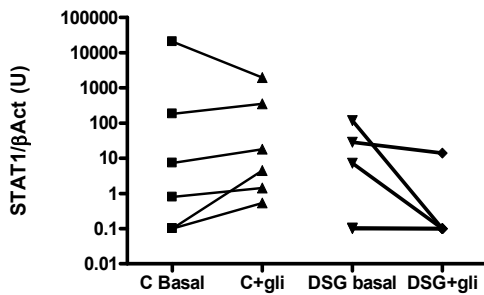
a)



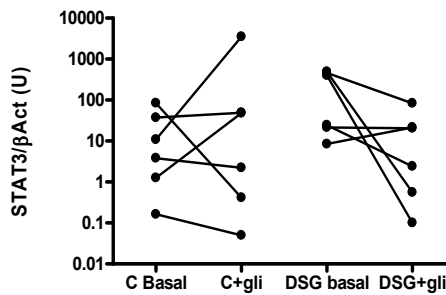
b)



c)



d)



Secreción de nitritos (a) y expresión intestinal, en unidades arbitrarias (U), del mRNA de IFN $\gamma$  (b), STAT 1 (c) y STAT3 (d), tras 3 horas de cultivo en presencia de solución de gliadina (+gli, 100 $\mu$ g/ml) y 21 horas en medio basal en pacientes control sanos no-EC (C) y pacientes EC tratados en dieta sin gluten (DSG). Se señalan las diferencias estadísticamente significativas

Es de señalar que los niveles basales de expresión del mRNA de IFN $\gamma$  se encontraban 80 veces más elevadas en los pacientes EC tratados en DSG (test U de Mann-Whitney:  $p= 0,002$ ) comparado con los individuos control no-EC. Además, la expresión basal de nitritos se encontraba aumentada también en este grupo de pacientes (test U de Mann-Whitney:  $p= 0,052$ ).



## DISCUSIÓN

En este capítulo se describe por primera vez, que sepamos, la existencia de una respuesta inmune innata mediada por la producción de IL-15 en individuos control no-EC en respuesta a un estímulo tanto de gliadina como de los péptidos sintéticos 19- y 33-mer.

Según el modelo de las 2 señales (3), se considera que algunos péptidos, como el 19-mer, ejercen una actividad tóxica induciendo la producción de IL-15, quedando la inmunidad adaptativa, secundaria a la presentación antigénica, asociada los péptidos inmunoadaptativos que no tendrían actividad tóxica directa. Contrariamente a lo esperable, el péptido 33-mer mostró tener una capacidad tóxica mucho más elevada que el 19-mer, ya que indujo la expresión de IL-15 en muchos más casos. Recientemente, otros autores también han encontrado que el péptido 33-mer parece ejercer por sí mismo un papel dual, tanto de desencadenante de la respuesta inmune adaptativa como de ser un inductor de la IL-15 (M. Londei, comunicación personal en *Celiac Disease Symposium NY, EEUU, 9-11 Nov 2006*). La explicación a este nuevo papel de inductor de la respuesta innata del 33-mer podría encontrarse en que la secuencia del péptido no inmunodominante 19-mer se encuentra incluida dentro del 33-mer, como se observa al alinear ambos péptidos (Tabla IV.1)

### Tabla IV.1

```

19-mer  LGQQQFPF-----PQ-----QP-----YPQPQPF
33-mer  L – QLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF

```

Alineamiento de los péptidos sintéticos libres de LPS usados en los cultivos. En negrita, los residuos de glutamina que sufren la desaminación por la transglutaminasa tisular para convertirse en glutamato y conferir carga negativa al péptido que aumenta su afinidad por la hendidura HLA-DQ2/DQ8.

Es interesante señalar que el péptido 33-mer incluye gran parte de la secuencia del 19-mer sumados a 3 inserciones (*gaps*), los cuales están precisamente implicados en la desaminación glutámica y, por tanto, en el acomodamiento de los péptidos en la hendidura HLA-DQ2/DQ8 (12). En consecuencia, parece lógico que los epítomos tóxicos puedan estar igualmente presentes en ambos péptidos, mientras que los epítomos inmunodominantes quedarán restringidos al 33-mer, ya que presentan aquellos residuos responsables

de conferir las cargas negativas responsable del aumento de afinidad por la molécula HLA-DQ2/8.

Es sabido que los LIEs, adquieren un comportamiento *NK-like* bajo determinadas condiciones de estrés, como parece desencadenar la gliadina (7). Recientemente se ha postulado que la población de células iNKT podría representar un porcentaje no despreciable del compartimento intraepitelial (42, 43, 44). Se sabe además que tras sufrir una estimulación y antes de expandirse durante 2 ó 3 días, dichas células iNKTs regulan a la baja la expresión tanto de su TCR como de sus marcadores de células NK, para retornar después a sus niveles basales (45). Si dicha población de linfocitos iNKT no es despreciable en el compartimento intraepitelial y responde al estímulo de gliadina incrementando la expresión de CD30, esto permitiría comprender por qué la inducción de CD30 se detectaba únicamente en la lámina propia y no en el compartimento intraepitelial. Así, los LIEs respondedores no serían detectables en este abordaje, ya que el análisis de expresión de CD30 se realizó dentro de la población CD3 que estaría intracelular en dichas células (45). Se deberían llevar a cabo nuevos estudios para abordar esta cuestión y confirmar si realmente la población iNKT es una población detectable en el intestino así como su posible implicación en la inmunopatogénesis celiaca. En cualquier caso, no cabe duda que los LLP sí responden ante el estímulo de gliadina, y es aquí donde existe un incremento de expresión de CD30 que puede ser bloqueada al co-incubar con anticuerpo anti-IL15. Además, la producción de IL-15 fue inducida por igual en respuesta a un estímulo de gliadina en todos los individuos, lo que confirma que la gliadina es un activador inespecífico de la inmunidad innata en todos los individuos.

Confirmando nuestra hipótesis, el incremento secundario de nitritos, y la expresión de los mediadores pro-inflamatorios IFN $\gamma$ , STAT1 y STAT3 únicamente pareció alterarse en los pacientes EC (aunque no eran estadísticamente significativas). Sin embargo, debido al escaso número de pacientes EC en DSG en los que se estudió la expresión de CD30 (2 pacientes), no se pudo determinar si su incremento de expresión inducido por gliadina era también mayor en dichos pacientes, como parece derivarse de los datos anteriores

Una posibilidad para explicar que la gliadina modifique la expresión de estos mediadores de forma específica en los pacientes EC, podría ser que la IL-15 así

inducida se mantuviese en el compartimento intracelular en los pacientes control no-EC, y que por tanto no fuese biológicamente activa. En este sentido, y si esto fuese verdad, se confirmarían los estudios previos que parecían apuntar a la inducción de IL-15 de forma específica en los pacientes EC (4). Esta posibilidad fue finalmente descartada, ya que se detectó también IL-15 en los sobrenadantes de todos los explantes pese a que nunca fue detectada en los sobrenadantes de los cultivos basales (Figura IV.4b). Queda sin embargo por comprender por qué los efectos inmediatos de la IL-15 se desencadenan únicamente en los pacientes EC. Es interesante que la secreción de nitritos se haya inducido en los pacientes EC en DSG, mientras que los niveles de mRNA de STAT1, STAT3 e IFN $\gamma$  tendieron a disminuir en estos pacientes. Esta disminución podría deberse al abordaje experimental realizado y los mecanismos de regulación de dichas moléculas. Es sabido que la regulación de algunas moléculas, como el IFN $\gamma$ , se realiza a nivel transcripcional, donde se encuentra una alta correlación entre los niveles proteicos y la expresión del mRNA (40). De esta forma, un estímulo antigénico que induzca IFN $\gamma$  implicará un incremento de expresión de su mRNA para producir más proteína. Una vez alcanzada la cantidad de proteína necesaria, y dado que se regula a nivel transcripcional, se reducirían los niveles de mRNA intracelulares para compensar la proteína ya producida, pudiendo llegarse incluso a niveles inferiores a los previos al estímulo. En nuestro abordaje experimental, las concentraciones y tiempos de estimulación representaban las que se asumen está expuesta la mucosa duodenal frente a los antígenos de la dieta (3 horas, 100 $\mu$ g/ml). Además, el cultivo se mantuvo otras 21 horas en condiciones basales para hacer el experimento en las condiciones lo más fisiológicas posibles y determinar si un estímulo innato es capaz de inducir una respuesta adaptativa secundaria. En consecuencia, probablemente estamos midiendo los niveles de las moléculas de mRNA sujetas a una regulación a la baja tras la regulación al alza que indujo el estímulo, ya que se determinaron los niveles de mRNA 21 horas después de retirar el estímulo.

Finalmente, los pacientes EC tratados en DSG presentaban una mayor expresión basal de IFN $\gamma$ , además de una mayor secreción basal de nitritos. Estos datos podrían cuestionar el estado real de remisión de la mucosa duodenal. Sin embargo, el resto de las moléculas estudiadas no presentaban modificaciones en su expresión al comparar ambos grupos. Por otro lado, todos los pacientes EC tenían serología negativa desde hacía al menos un año, y las biopsias fueron

caracterizadas como Marsh 0-1, lo que definitivamente parece descartar dicha posibilidad y podría apuntar a una mayor expresión basal de forma constitutiva de este mediador inflamatorio.

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo confirman la hipótesis de que el gluten es una proteína tóxica capaz de desencadenar una respuesta inmune innata en el intestino de todos los individuos, determinada tanto por activación linfocitaria como por secreción de IL-15. Esta respuesta innata ha sido observada tanto en pacientes EC tratados en DSG como en controles no-EC, pese a que la alteración secundaria de los niveles de las vías STAT1 y STAT3, y la expresión de IFN $\gamma$  se encontró modificada únicamente en los pacientes EC. En consecuencia, proponemos que los pacientes EC, además del HLA-DQ2/DQ8, necesitarían un menor umbral de respuesta para desencadenar la inmunidad adaptativa TH1, verdadera efectora de la EC. Este menor umbral de respuesta podría estar caracterizado una expresión basal mayor de algunos mediadores inmunológicos, como son la mayor secreción de nitritos y los niveles de IFN $\gamma$ . Además, otros factores podrían contribuir al desencadenamiento de la respuesta secundaria, como un defecto constitutivo en la integridad de las *tight-junctions* entre los enterocitos que facilite el paso de los péptidos tóxicos a la lámina propia (24, 25), o una mayor sensibilidad a la IL-15 por parte de los pacientes EC, que podría estar mediada por una densidad aumentada del receptor IL15R $\alpha$  como se ha descrito recientemente (46).

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Maki M, Collin P. (1997) Celiac disease. *Lancet*. Jun 14;349(9067):1755-9
- 2 Sollid LM. (2002) Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):647-55.
- 3 Brandtzaeg P. (2006) The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett*. Jun 15;105(2):127-39.
- 4 Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease. *Lancet*. Jul 5;362(9377):30-7.
- 5 Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. (2006) Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in celiac disease. *Gut*. Apr;55(4):469-77.
- 6 Hùe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004 Sep;21(3):367-77.
- 7 Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee L, Tretiakova M, Semrad C, Kistner E, Winchester RJ, Braud V, Lanier LL, Geraghty DE, Green PH, Guandalini S, Jabri B. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1343-55.
- 8 Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002 Sep 27;297(5590):2275-9.
- 9 Skovbjerg H, Koch C, Anthonsen D, Sjöström H. Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 5;1690(3):220-30.
- 10 Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AV. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med*. 2000 Mar;6(3):337-42.
- 11 Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 2002 Sep;123(3):803-9.
- 12 Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J; European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003 Apr;64(4):469-77.
- 13 Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):331-41.
- 14 Raki M, Tollefsen S, Molberg O, Lundin KE, Sollid LM, Jahnsen FL. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*. 2006 Aug;131(2):428-38.
- 15 Yoshimura S, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. *Eur J Immunol*. 2001 Jun;31(6):1883-93.
- 16 Ouaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):257-70.

## *CAPÍTULO IV*

---

### *¿Realmente la gliadina es inocua para los no celíacos?*

17 Dubois SP, Waldmann TA, Muller JR. Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8662-7

18 Ohteki T, Tada H, Ishida K, Sato T, Maki C, Yamada T, Hamuro J, Koyasu S. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med*. 2006 Oct 2;203(10):2329-38.

19 Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996 Mar;17(3):138-46

20 Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid M, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology*. 1998 Sep;115(3):551-63.

21 Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):816-22.

22 Sander GR, Cummins AG, et al.. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett*. 2005 Aug 29;579(21):4851-5.

23 Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, et al. (2006) Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. Apr;41(4):408-19.

24 Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. Feb;52(2):218-23.

25 Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, et al. (2006) Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. Apr;41(4):408-19.

26 Dolfini E, Elli L, Roncoroni L, et al. (2005) Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model. *World J Gastroenterol*. 2005 Oct 14;11(38):5973-7.

27 Jelinkova L, Tuckova L, Cinova J, et al. (2004) Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Lett*. Jul 30;571(1-3):81-5.

28 Nikulina M, Habich C, Flohe SB, et al. (2004) Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol*. Aug 1;173(3):1925-33.

29 Thomas KE, Sapone A, Fasano A, et al. (2006) Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2512-21.

30 Cinova J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, et al. (2007) Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol*. Mar;27(2):201-9. Epub 2007 Jan 27.

31 Hudson DA, Cornell HJ, Purdham DR, et al. (1976) Non-specific cytotoxicity of wheat gliadin components towards cultured human cells. *Lancet*. Feb 14;1(7955):339-41

32 Rocca E, Paganuzzi Stamatii A, et al. (1983) Effects of gliadin-derived peptides from bread and durum wheats on in vitro cultures of human cell lines. Implications for celiac disease pathogenesis. *Toxicol Lett*. May;16(3-4):331-8.

33 Dolfini E, Elli L, Dasdia T, et al. (2002) In vitro cytotoxic effect of bread wheat gliadin on the LoVo human adenocarcinoma cell line. *Toxicol In Vitro*. Aug;16(4):331-7.

34 Dolfini E, Elli L, Roncoroni L, et al. (2005) Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model. *World J Gastroenterol*. Oct 14;11(38):5973-7.

- 35 Giovannini C., Mancini E., E. De Vincenzi M. (1996) Inhibition of the cellular metabolism of Caco-2 cells by prolamin peptides from cereals toxic for celiacs. *Toxicology in Vitro* 10 (1996) 533-538
- 36 Giovannini C., Lechetti R., De Vincenzi M (1997) The activities of peptides "31-43", "44-55" and "56-68" of A-gliadin on in vitro cultures of CaCo-2 cells. *ATLA* 25, 437-443
- 37 Giovannini C, Sanchez M, Straface E, et al (2000) Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology*. 2000 Apr 7;145(1):63-71.
- 38 Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, et al. (2003) Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett*. Apr 10;540(1-3):117-24.
- 39 Bulfone-Paus S, Dürkop H, Paus R, Krause H, Pohl T, Onu A. Differential regulation of human T lymphoblast functions by IL-2 and IL-15. *Cytokine*. 1997 Jul;9(7):507-13.
- 40 Leon, A.J. Marcadores inflamatorios en la Enfermedad Celíaca, enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Pediatría, Inmunología, Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia. 2006.
- 41 Gómez E. Vías de activación intracelular de citocinas en el intestino de pacientes con Enfermedad Celíaca, enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Pediatría, Inmunología, Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia. 2007.
- 42 van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Nishi N, Kölgen W, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol*. 2004 Jul;112(1):8-23.
- 43 van Dieren JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Escher JC, Samsom JN, Blumberg RS, Nieuwenhuis EE. (2007) Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis*. May 2; [Epub ahead of print]
- 44 Zeissig S, Kaser A, Dougan SK, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS. Role of NKT cells in the digestive system. III. Role of NKT cells in intestinal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Dec;293(6):G1101-5.
- 45 Yu KO, Porcelli SA. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett*. 2005 Aug 15;100(1):42-55.
- 46 Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. (2006) Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in celiac disease. *Gut*. Apr;55(4):469-77.





# *CAPÍTULO V*

## *MENOR UMBRAL DE RESPUESTA A IL-15 EN LA EC*

*Manuscrito enviado para publicación*



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC), es una hipersensibilidad del intestino delgado frente al trigo y otros cereales que contienen gluten (cebada, centeno y probablemente avena) en individuos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8) (1,2). Esta enteropatía, que se caracteriza por una linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y aplanamiento de las vellosidades, está desencadenada por péptidos inmunodominantes, como el 33 mer (3). Cuando estos péptidos alcanzan la lámina propia, algunos son desaminados por la enzima transglutaminasa tisular (4), para ser presentados por las células presentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas (5,6), en el contexto de las moléculas HLA-DQ2/DQ8. Como resultado, se induce una proliferación clonal de linfocitos que desencadena una respuesta proinflamatoria tipo TH1 caracterizada principalmente por la producción de IFN $\gamma$ . El tratamiento actual es una dieta estricta sin gluten (DSG) de por vida, lo que lleva a una completa remisión de la sintomatología y la mejoría histológica de la mucosa (1,2).

En la actualidad, el modelo más aceptado para explicar la inmunopatogénesis de la EC es el modelo de las dos señales (7), en el que la inmunidad innata juega también un papel crucial, a través de un mecanismo independiente de DQ2 en el desarrollo de la EC (8,9). En este contexto, algunos péptidos tóxicos, como el 19-mer, desencadenan una respuesta inmunológica innata (10) caracterizada por la producción de IL-15 por los enterocitos (11). Como consecuencia, se altera la función barrera epitelial, tanto por un aumento directo de la permeabilidad relacionado con las *tight-junctions* (12,13), como por la inducción de apoptosis de los enterocitos secundaria a la reprogramación de tipo NK (*NK-like*) de los linfocitos intraepiteliales (14,15,16,17). De esta manera, los péptidos inmunodominantes, como el 33-mer, pueden alcanzar la lámina propia donde son presentados por las células dendríticas a las células T (18, 19), que de esta manera actúan como nexo de unión entre la primera señal innata y la segunda señal adaptativa, verdadera responsable de la inmunopatogénesis.

Esta primera señal innata, inespecífica, e independiente de HLA-DQ2/DQ8, ha sido propuesta como específica de los pacientes con EC (10). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún factor diferencial que controle esta respuesta inmunológica. Tras realizar experimentos de estimulación antigénica en cultivo de biopsia intestinal, hemos observado que la inducción de la IL-15 en

respuesta a la gliadina se desencadena tanto en muestras de pacientes EC como de pacientes controles sanos no-EC (20), pese a que los mediadores de la inmunidad adaptativa únicamente se encontraban modificados en los pacientes EC.

Ya que la primera señal (innata) inducida por el gluten es observada por igual tanto en individuos EC como no-EC, mientras que la segunda señal (adaptativa) es exclusiva de los pacientes EC, y dado que estos pacientes expresan una mayor densidad de receptores para la IL-15 (IL15R $\alpha$ ) en el duodeno, que se mantiene incluso en situación de DSG (11), es tentador especular que esta mayor expresión del receptor pueda tener un papel biológico en la inmunopatogénesis de la EC. De esta forma, la producción de IL-15 inducida por la gliadina sería capaz de desencadenar una respuesta inmunológica en los pacientes EC, aunque podría no ser suficiente para alcanzar el umbral de respuesta necesaria para el desarrollo de la enteropatía en los pacientes EC.

Para evaluar dicha hipótesis, en este capítulo se estudió la expresión IL15R $\alpha$  en el duodeno de pacientes con EC, tanto tratados como no tratados, y en un grupo de pacientes controles. Dado que se confirmó la mayor expresión del receptor en los pacientes EC, con independencia de la dieta, también se procedió a realizar estudios de estimulación con IL-15 de biopsias duodenales de pacientes EC tratados en DSG, como de pacientes control no-EC, para evaluar la hipótesis de un menor umbral de respuesta a dicha citocina en los pacientes EC.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Sujetos de estudio**

En este capítulo se estudió un total de 42 pacientes con EC (edad media 21,24 años, rango 2-68 años, 30,95% varones), de los cuáles 22 se encontraban en DSG (edad media 34,36 años, rango 7-68 años, 31,82% varones) y 20 se encontraban sin tratar (edad media 6,80 años, rango 2-38 años, 30,00% varones). Como controles, se incluyó un grupo de 24 pacientes sanos no-EC (edad media 53,04 años, rango 16-81, 20,83% varones), ninguno de los cuales presentaba alteración histológica duodenal ni implicaba sospecha de EC (que nunca fue confirmada). Todos los pacientes fueron recogidos en los Servicios de Gastroenterología y Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, y en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Valle del Nalón de Asturias.

### **Preparación de las muestras**

Un total de 66 explantes duodenales, 24 de pacientes controles y 42 de pacientes con EC (22 no tratados y 20 en DSG) fueron recogidos en solución RNAlater e inmediatamente congelados. Las proteínas totales y el RNA fueron extraídos según el procedimiento de TRIZOL<sup>®</sup>, y el cDNA, obtenido mediante el kit SuperScript<sup>®</sup> First-Strand Synthesis System for reverse Transcriptase (RT)-PCR.

### **Cultivos de biopsia**

Los cultivos de biopsia se realizaron sobre 10 pacientes EC tratados en DSG (edad media 43,64 años, rango 23-68 años, 18,18% varones) y 23 pacientes sanos no-EC (edad media 53,04 años, rango 16-81 años, 20,83% varones) como se describió previamente. Siempre que fue posible, los explantes fueron también cultivados con la adición de IL-15 (50ng/ml, Pierce Biotechnology Inc. IL, USA) (7 pacientes EC en DSG, edad media 47,71 años, rango 25-68 años, 0% varones y 10 pacientes controles no-EC, edad media 53,6 años, rango 23-66, 10% varones). En estos casos, el cultivo basal constituyó un control interno. Tras 3 horas de cultivo, los explantes fueron lavados en HBSS-Gentamicina (500 µg/ml Life Technologies-GIBCO) y posteriormente transferidos a un nuevo medio de cultivo por otras 21 horas para determinar si un estímulo innato es seguido de una respuesta inmune secundaria. Tras 24 horas de cultivo (3 horas con estímulo + 21 hora en medio

basal), el explante fue embebido en RNAlater e inmediatamente congelado hasta la extracción proteica y de RNA.

### **Western-blot de IL-15**

Se utilizó un total 8µg de proteínas de los extractos completos de biopsias intestinales cultivadas en medio basal (7 pacientes con EC en DSG, y 10 pacientes controles no-EC). Como control positivo se utilizó IL-15 recombinante humana (Preprotech).

### **Estudios de inmunofluorescencia**

Se estudió la expresión del receptor de la IL-15 en muestras tanto de pacientes controles no-EC sin ninguna alteración histológica, como de pacientes EC en actividad al momento de diagnóstico.

### **Estudios de PCR cuantitativa**

Se determinaron los niveles de mRNA de IL15R $\alpha$ , iNOS, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , y  $\beta$ -actina (usado como gen *house keeping*). Las secuencias de los *primers*, así como sus condiciones de PCR están descritos en la Tabla III.1. Hasta el momento se han descrito al menos 8 isoformas diferentes de IL15R $\alpha$ , algunas de las cuáles son secretadas (21). Para evitar artefactos en el estudio, el *primer* reverso se localizó entre los exones 6 (región transmembrana) y 7 (cola citoplasmática), amplificándose únicamente isoformas de membrana no secretadas. El *primer* sentido se localizó en el exón 3, en la región de unión entre el dominio de unión y la región rica en Pro/Thr (21). A todas las moléculas que no presentaron niveles detectables de expresión, se les asignó un valor arbitrario de 0.1.

### **Moléculas efectoras en los sobrenadantes**

La determinación de óxido nítrico en los sobrenadantes a las 3 horas de cultivo se realizó mediante la reacción de Griess para determinación de nitritos ya descrita. Los sobrenadantes finales (tras 3 horas de cultivo con estímulo y otras 21 horas en medio basal) se estudiaron en un ensayo multiplex utilizando una plataforma Luminex, descrita previamente. Las citocinas determinadas, y sus niveles de detección (L.D.) fueron: interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (L.D. 0,542pg/ml), factor de necrosis

tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (L.D. 0,356pg/ml), interleucina (IL)-12p70 L.D. 0,927pg/ml) e IL-2 (L.D. 4,422pg/ml). Los valores por debajo de los niveles de detección fueron asignados como iguales a dicho valor.

### **Análisis estadístico**

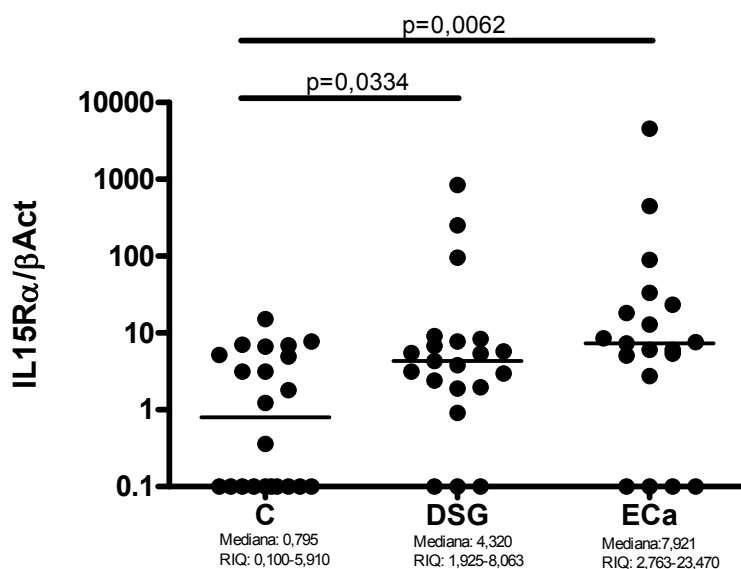
Se aplicó una estadística no paramétrica para la evaluación de los niveles de mRNA, nitritos o expresión proteica entre grupos, mediante los tests Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Cuando se compararon diferentes condiciones de cultivo del mismo paciente se aplicó una estadística pareada no paramétrica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

## RESULTADOS

Los pacientes EC expresan niveles más elevados de mRNA de IL15R $\alpha$ 

Los niveles del mRNA de IL15R $\alpha$  fueron estudiados en muestras de biopsia duodenal no cultivadas tanto de pacientes EC (tratados y no tratados) como en pacientes controles sanos no-EC. La expresión de IL15R $\alpha$  no se encontró afectada por la edad ni por el género (datos no mostrados). En la Figura V.1 se observa que la expresión de IL15R $\alpha$  es mayor en los pacientes EC, con independencia de la ingesta de gluten, respecto a la de los pacientes control no-EC.

Figura V.1



Expresión intestinal, en unidades arbitrarias, del mRNA de IL15R $\alpha$  en unidades arbitrarias (U) en biopsias no tratadas de pacientes control sanos no-EC (C, n=22) y pacientes EC, tanto tratados en dieta sin gluten (DSG, n=20) como en actividad (ECa, n=19).

Se señalan las diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico.

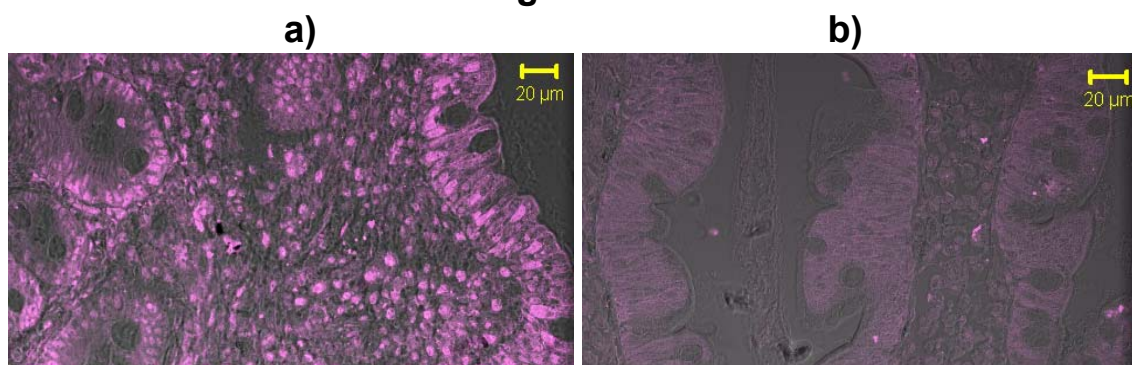
Es de señalar que no se encontraron diferencias significativas en la expresión entre los pacientes tratados y los no tratados, lo que descarta una mayor expresión del receptor como consecuencia de la inflamación, y parece apuntar a la existencia de diferencias constitutivas y/o a una condición primaria en los pacientes EC. Finalmente, debe indicarse también que la expresión del receptor presenta una distribución bimodal, que se hace especialmente patente en el grupo de pacientes control no-EC. En este caso, los pocos pacientes con niveles detectables de receptor mostraron un rango de expresión similar al de los pacientes con EC.



### **Expresión tisular de IL15R $\alpha$**

El análisis por microscopía confocal confirmó la mayor expresión del receptor en los pacientes con EC. En este grupo, se encontró un gran número de células IL15R $\alpha$ + tanto en el epitelio como en la lámina propia y en el área de las criptas (Figura V.2a). Por el contrario, en las secciones de pacientes control no-EC, se encontraron muy pocas células positivas, estando la mayoría de ellas localizadas en la lámina propia (Figura V.2b). Atendiendo a la morfología y la localización de las células IL15R $\alpha$ +, podría concluirse que en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos las células que expresan este receptor pertenecen a diferentes linajes.

**Figura V.2**



Análisis representativo de la expresión del receptor de la IL-15, determinado mediante microscopía confocal, en un paciente EC en actividad (a) y en un paciente control no-EC. IL15R $\alpha$  se encontró principalmente asociado a la membrana nuclear.

Como se puede apreciar, la mayoría de la expresión de IL15R $\alpha$  se encontró asociada a la membrana nuclear, como había sido descrito previamente (22). Dado que sólo las isoformas que no expresan el exón 2, (encargado de unir la IL-15 y, por tanto, de conferir actividad biológica al receptor) no co-localizan con la membrana nuclear, los resultados obtenidos confirman la diferencia no sólo respecto a una mayor expresión del receptor en los pacientes EC, sino además, de un receptor que es biológicamente activo, ya que mantiene la capacidad de unión de la IL-15.

### **El mRNA de IL15R $\alpha$ es inducido por IL-15 únicamente en los pacientes no-EC.**

A continuación se realizaron estudios funcionales para valorar la modulación de IL15R $\alpha$ , mediante la estimulación de biopsia duodenal con IL-15 tanto en pacientes controles no-EC (10 pacientes) como en pacientes EC tratados en DSG (7 pacientes). Tras el cultivo basal, los extractos proteicos de los explantes fueron

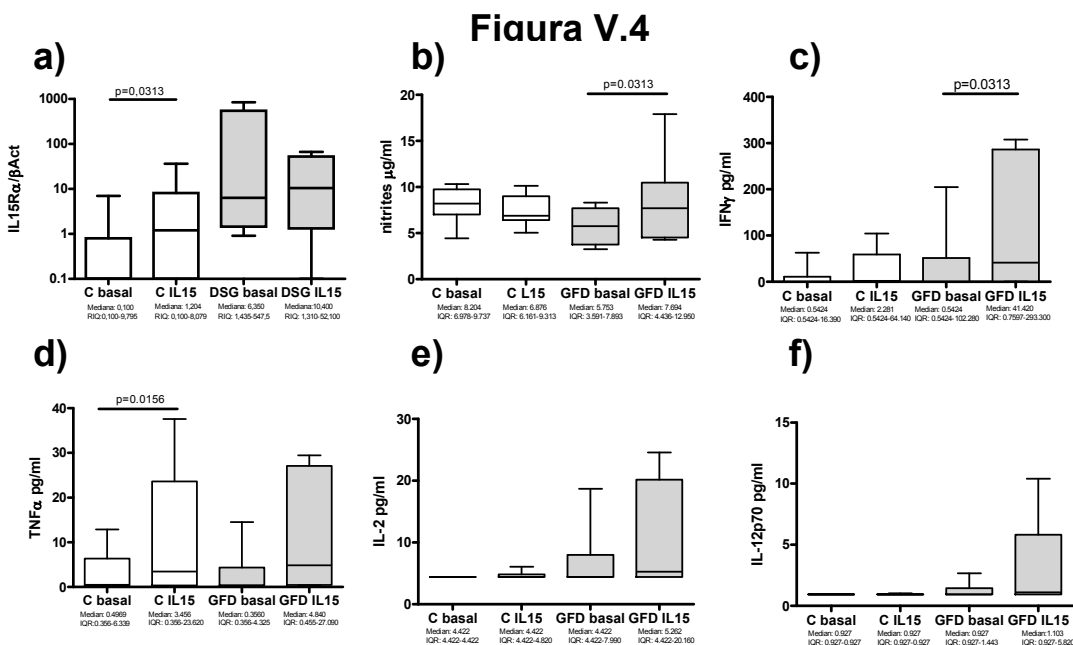
evaluados para determinar la expresión de IL-15 mediante Western-blot. Esta citocina fue encontrada únicamente en un paciente con EC, que fue descartado en el resto de estudios funcionales para poder medir correctamente la respuesta a un estímulo exógeno de IL-15 (Figura V.3). Por tanto, los estímulos con IL-15 únicamente se realizaron con 6 pacientes EC en DSG.

Figura V.3



Western-blot representativo de los extractos protéicos de los cultivos basales de pacientes control no-EC (líneas 1-3) y de pacientes EC tratados en DSG (líneas 4-6). C: IL-15 recombinante humana. No se encontraron en ningún caso niveles detectables de IL-15 en los pacientes control no-EC, mientras que sólo uno de los 7 pacientes EC en DSG fue positivo para esta citocina (línea 6).

Después de 3 horas de estimulación con IL-15, y 21 horas en medio de cultivo basal, la expresión del receptor fue inducida únicamente en los pacientes control no-EC, mientras que no se observaron modificaciones en los pacientes con EC (Figura V.4a)



Expresión intestinal, en unidades arbitrarias (U), del mRNA de IL15Rα tras 24 horas de cultivo (a); y secreción de nitritos (b) tras 3 horas de cultivo y de IFNγ (c), TNFα (d), IL-2 (e) e IL-12p70 (f) tras 24 horas, tanto de pacientes control sanos no-EC (C, n=10) como de pacientes EC tratados en dieta sin gluten (DSG, n=6) en cultivos basales y tras estímulos con IL-15 (3 horas de estímulo + 21 horas basales). Se señalan las diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, p<0,05). Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico.

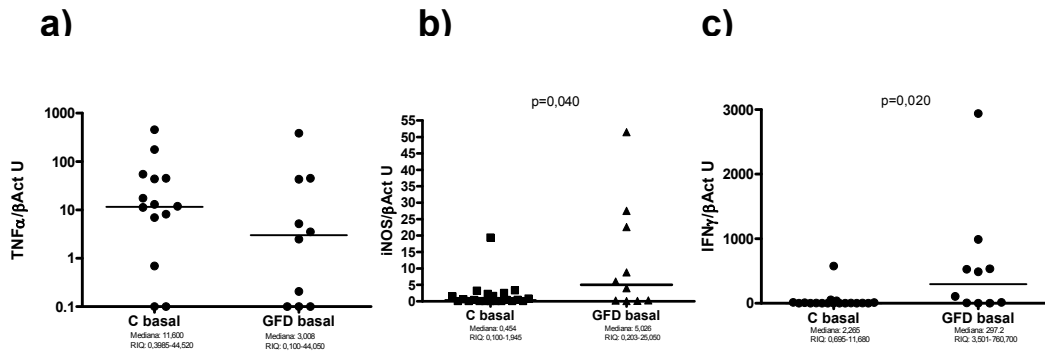
**Mayor respuesta inmunológica a la IL-15 en los pacientes EC.**

Para responder a la pregunta de si la mayor expresión al receptor encontrada en los pacientes EC podría estar implicada en una mayor respuesta inmunológica a esta citocina en estos pacientes, se estudiaron también explantes de biopsia duodenal estimulados con IL-15. Sorprendentemente, y tras sólo 3 horas de cultivo, los mediadores de la inmunidad innata, como los nitritos derivados de la secreción de óxido nítrico, se encontraron aumentados en los cultivos de los pacientes EC estimulados con IL-15, mientras que su expresión no se modificó en los explantes de los pacientes no-EC (Figura V.4b). De hecho, al final de los cultivos (tras 3 horas de estímulo más 21 horas en medio basal), el mediador pro-inflamatorio IFN $\gamma$  sólo había sido estimulado en las muestras de los pacientes EC, mientras que se mantuvo sin cambios en los explantes de los pacientes control sanos no-EC (Figura V.4c). Por el contrario, el mediador TNF $\alpha$  fue estimulado, aunque apenas significativo en los pacientes EC ( $p=0,0625$ ), tanto en los controles sanos no-EC como en los pacientes EC (Figura V.4d). Finalmente, no se observaron modificaciones en la expresión de la citocina IL-12 ni de la sub-unidad IL-12p70, tras los estímulos con IL-15, tanto en el caso de los pacientes con EC, como en los controles sanos no-EC (Figura V.4e y V.4f respectivamente)

**Mayor expresión basal de mediadores pro-inflamatorios en los pacientes EC**

Tras descartar diferencias en la secreción de los mediadores inflamatorios (nitritos, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12p70), en las muestras de los pacientes EC y de los controles sanos no-EC (datos nos mostrados), se estudió si la mayor respuesta a la IL-15 encontrada en los pacientes EC podría ser debido no solo a la mayor expresión basal de su receptor sino también consecuencia de una mayor expresión constitutiva de los precursores pro-inflamatorios que respondieron a esta citocina (es decir, sus mRNA). Por tanto, se evaluó la expresión basal de los precursores de mRNA de estos mediadores que responden a la IL-15 (iNOS, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), en muestras de 10 pacientes con EC tratados, y de 24 pacientes control sanos no-EC. La expresión de TNF $\alpha$  fue similar en ambos grupos (Figura V.5a). Sin embargo, en las muestras de los pacientes con EC, se encontraron niveles de mRNA más elevados tanto de iNOS (figura V.5b) como de IFN $\gamma$  (figura V.5c).

**Figura V.5**



Expresión intestinal, en unidades arbitrarias (U), del mRNA de TNF $\alpha$  (a), iNOS (b) e IFN $\gamma$  (c) en explantes de biopsia duodenal de pacientes controles no-EC (C, n=23) y de pacientes tratados en dieta sin gluten (DSG, n=10) tras 24 horas de cultivo basal.

Se señalan las diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico.

**DISCUSIÓN**

En este capítulo se ha descrito por primera vez, que sepamos, la existencia de una respuesta más intensa en los pacientes EC tratados con DSG tras el estímulo con IL-15, comparado con los pacientes control no-EC. Además, se ha confirmado la mayor expresión de IL15R $\alpha$  en el duodeno de los pacientes EC, como previamente había sugerido Di Sabatino et al. (11), y con independencia de la ingesta de gluten y/o del estado de inflamación. El número de células que expresaron el receptor en los pacientes EC resultó además mucho más elevado que en los pacientes control no-EC, no sólo en términos cuantitativos sino también cualitativos. De esta forma, y dado que tanto la localización como la morfología de las células IL15R $\alpha$ + fue diferente, parece claro que también existen diferencias en los distintos linajes celulares que expresaron el receptor (Figura V.2). Curiosamente, la mayor parte de la expresión del receptor se encontró asociada principalmente a la membrana nuclear, tal como se había descrito previamente (22). Por tanto, los resultados presentados en este capítulo apuntan a que los pacientes con EC tienen una expresión mayor no sólo del receptor, sino de su isoforma biológicamente activa, ya que sólo aquellas isoformas que no co-localizan con la membrana nuclear (y que tampoco expresan el exon 2) no son capaces de unir la IL-15 (22). Esto podría confirmar la hipótesis de una mayor respuesta a la IL-15 en los pacientes con EC. De acuerdo al modelo de las 2 señales de la inmunopatogénesis de la EC (7), en este capítulo se propone que la primera señal inducida por la gliadina en el intestino, es decir, la liberación de IL-15, podría conducir más fácilmente al desencadenamiento de la segunda señal inmunológica en los pacientes con EC y, por tanto, induciría más fácilmente el desarrollo de la enteropatía en estos individuos.

Pese a que varios estudios anteriores habían sugerido que la IL-15 permanece aumentada en todos los pacientes EC, con independencia de la DSG (14, 23), los resultados aquí obtenidos señalan que la mayor expresión de su receptor es independiente de la expresión de la IL-15, ya que esta prácticamente no fue detectada en las muestras de los pacientes EC. Estos datos, confirman observaciones previas realizadas por nuestro grupo, mediante estudios de Western-blot e inmunohistoquímica, en las que se había sugerido que la IL-15 tendría un papel muy temprano en el inicio de la respuesta inmune innata, debido a que se encontraba ausente en las muestras de pacientes EC, tanto en actividad como

tratados (24). Por tanto, y dado que la mayor expresión del receptor es independiente tanto de su ligando como de la condición inflamatoria del intestino (no se encontraron diferencias entre las muestras de los pacientes tratados y no tratados), los resultados aquí presentados parecen apuntar a la existencia de diferencias primarias en la expresión de IL-15R, que podría representar un nuevo condicionante genético implicado en la inmunopatogénesis de la EC.

Es interesante señalar que los precursores de las moléculas efectoras respondedoras a la IL-15 (nitritos e IFN $\gamma$ ), también se encontraron incrementados en las muestras de los pacientes EC tratados con DSG. Pese a que estos resultados podrían cuestionar el estado real de remisión de la mucosa duodenal, todas las muestras de los pacientes con EC fueron caracterizadas como Marsh- 0-1, además de presentar una serología negativa desde hacía al menos un año, lo que apunta a una mucosa completamente recuperada. De hecho, el TNF $\alpha$ , que respondió por igual al estímulo en ambos grupos de pacientes, no se encontró expresado diferencialmente entre ambos grupos. Curiosamente, en un trabajo reciente se ha sugerido que los linfocitos intraepiteliales son una fuente importante de IFN $\gamma$  en la EC (25, 26), persistiendo esta producción incluso tras el tratamiento con DSG. Si se considera que el IFN $\gamma$ , a través de un mecanismo NF- $\kappa$ B dependiente, es un potente inductor de iNOS (27), puede comprenderse así la mayor expresión basal de ambos mediadores en las muestras de los pacientes con EC. Como consecuencia, tanto esta expresión basal más elevada del receptor de la IL-15, como del IFN $\gamma$  e iNOS, encontradas en este capítulo, podría conjuntamente conducir más fácilmente a una respuesta inmunológica mayor frente al estímulo de IL-15 y, por tanto, derivando en un menor umbral de respuesta inmunológica que desencadenaría más fácilmente la segunda señal adaptiva, verdadera efectora de la inmunopatogénesis. En consecuencia, la mayor expresión de IL-15R $\alpha$  sería otro factor predisponente en el desarrollo de la EC. De hecho, es notorio el que dicho receptor se expresó en la mayoría de los pacientes EC (85,71% de los pacientes en DSG y 78,91% de los pacientes no tratados), mientras que sólo fue detectable en el 45,45% de las muestras de los individuos controles sanos no-EC (Figura V.1). Así, la expresión del receptor de la IL-15 es revelada como otro factor predisponente de efector menor en la inmunopatogénesis de la EC, junto con otros factores de efecto también menor, como la permeabilidad aumentada (*tigh-junctions*), hipersecreción de IL-15, etc., que

actuarían con efecto aditivo junto con el principal factor desencadenante conocido hasta ahora (HLA-DQ2/DQ8) hasta alcanzar un valor umbral de acumulación de factores de riesgo y con él de desencadenamiento de la EC.

Como se ha comentado en el capítulo IV, la gliadina parece ser un potente estimulador de la respuesta inmune innata en todos los modelos biológicos estudiados. De hecho, en el capítulo IV se ha demostrado, mediante cultivo y estimulación de biopsias duodenales, que la gliadina parece ser un inductor inespecífico de la IL-15 en todos los individuos, tanto EC como no-EC, a través de un mecanismo aun no completamente dilucidado, y de un receptor todavía por aclarar. Sin embargo, este modelo fisiológico de inducción de IL-15 por parte de la gliadina en todos los individuos no parece reflejar la situación *in vivo*, ya que aunque la IL-15 podría no ser suficiente para desencadenar la inmunidad adaptativa en todos los individuos, se esperaría que al menos tuviese alguna función biológica en todos ellos, ya que incluso fue detectada en los sobrenadantes de los cultivos (Figura IV.4), descartando por tanto un almacenaje intracelular que pudiese restringir su actividad biológica. Por tanto, tras una comida normal con ingesta de gluten, si el modelo fisiológico fuese correcto se esperaría encontrar en todos los individuos algunos efectos derivados de la acción de la IL-15, como podría ser la activación de las células dendríticas de la lámina propia, reprogramación *NK-like* de los linfocitos intraepiteliales o incluso apoptosis enterocitaria a través de un mecanismo dependiente de MICA-NKG2D. Sin embargo, la gliadina no sólo es tolerada por más del 99% de la población, sino que las características mencionadas parecen ser específicas de la inmunopatogénesis celiaca, lo que parece apuntar que quizás la actividad biológica de la IL-15 inducida por la gliadina en el duodeno no sea la misma en los individuos control no-EC y en los pacientes con EC.

Los resultados presentados, tanto la mayor expresión de IL15R $\alpha$  como de mediadores pro-inflamatorios, apoyan la hipótesis de que los pacientes con EC muestran un menor umbral de respuesta a la IL-15. Esta hipótesis permitiría explicar por qué la primera señal inmunológica (innata) inducida por la gliadina (producción de IL-15) no es específica, mientras que la segunda señal pro-inflamatoria sí resultaría característica en estos individuos. Este menor umbral de respuesta se asocia a la expresión aumentada de su receptor, actuando junto a otros factores predisponentes. Si se considera que la IL-15 inducida por la gliadina no es constante sino que es inducida en picos tras su ingesta, se puede comprender fácilmente como

la IL-15 así inducida determina la inducción de su receptor en los individuos no-EC (Figura V.4a), mientras que podría ser biológicamente activa de forma inmediata en los pacientes con EC consecuencia de la mayor expresión de IL15R $\alpha$ . Es más, recientemente se ha observado en un modelo de ratón (28) que las células IL15R $\alpha$  pueden capturar y almacenar de forma estable las moléculas de IL-15, actuando como reservorios intracelulares de dicha citocina que podrían secretarla poco a poco a la matriz extracelular, para mantener un ambiente inmunológico con alta expresión de IL-15 biológicamente activa (28). En consecuencia, la mayor expresión del receptor encontrada en los pacientes EC podría actuar como un reservorio para la IL-15 y, en consecuencia, llevar a la magnificación de los efectos de esta citocina en el microambiente duodenal de los pacientes con EC.

En conclusión, en este capítulo se propone un modelo en el que la gliadina sería un inductor de una respuesta inmune innata mediada por IL-15 observada en todos los individuos (20). Para explicar por qué esta respuesta no es igual de eficiente en todos los individuos, o al menos en aquellos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8), proponemos la existencia de un menor umbral de respuesta inmunológica a la IL-15 en los pacientes EC, que facilitaría el desarrollo de una respuesta inmune pro-inflamatoria. Este menor umbral de respuesta estaría probablemente mediado por la mayor densidad del receptor de IL-15, junto con otros factores aun no completamente dilucidados, como podría ser la mayor expresión basal de mediadores pro-inflamatorios. Esta situación determinaría que el intestino fuera mucho más susceptible a la IL-15 en los pacientes EC, facilitando la respuesta adaptativa, mientras que en los pacientes no-EC, esta IL-15 apenas sería suficiente para alcanzar el umbral respuesta y con él el desarrollo de la enteropatía.



**BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Maki M, Collin P. (1997) Celiac disease. *Lancet*. Jun 14;349(9067):1755-9
- 2 Sollid LM. (2002) Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):647-55.
- 3 Shan L, Molberg O, Parrot I, et al (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. Sep 27;297(5590):2275-9.
- 4 van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, et al. (1998) Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol*. Aug 15;161(4):1585-8.
- 5 Qiao SW, Bergseng E, Molberg Ø, et al. (2004) Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol*. Aug 1;173(3):1757-62
- 6 Raki M, Tollefsen S, Molberg et al. (2006) A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*. Aug;131(2):428-38.
- 7 Brandtzaeg P. (2006) The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett*. Jun 15;105(2):127-39.
- 8 Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. (2005) Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol*. May;42(8):913-8.
- 9 Jabri B, Sollid LD (2006) Mechanism of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. Sep;3(9):516-25
- 10 Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease. *Lancet*. Jul 5;362(9377):30-7.
- 11 Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. (2006) Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in celiac disease. *Gut*. Apr;55(4):469-77.
- 12 Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, et al. (2003) Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. Sep;125(3):696-707.
- 13 Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. Feb;52(2):218-23.
- 14 Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, et al. (2000) Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. Oct;119(4):996-1006.
- 15 Meresse B, Chen Z, Ciszweski C, et al. (2004) Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*. Sep;21(3):303-4.
- 16 Hue S, Metion JJ, Monteiro RC, et al. (2004) A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. Sep;21(3):303-4.
- 17 Ebert EC. (2005) IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN-gamma and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunology*. May;115(1):118-26.
- 18 Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, et al. (1995) Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from celiac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut*. Dec;37(6):766-76.

- 19 Rossi M, Young JW. (2005) Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* Aug 1;175(3):1373-81.
- 20 Bernardo D, Garrote JA, Fernández-Salazar L, et al. (2007) Is gliadin really safe for non-celiac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-celiac individuals challenged with gliadin peptides. *Gut.* Jun;56(6):889-90
- 21 Budagian V, Bulanova E, Paus R, et al. (2006) IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.* Aug;17(4):259-80.
- 22 Dubois S, Magrangeas F, Lehours P, et al. (1999) Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J Biol Chem.* Sep 17;274(38):26978-84.
- 23 Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, et al. (2003) Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology.* Sep;125(3):730-45.
- 24 León AJ, Garrote JA, Blanco-Quirós A, et al. (2006) Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol.* Dec;146(3):479-85.
- 25 Olausson RW, Johansen FE, Lundin KE, et al. (2002) Interferon-gamma-secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scand J Immunol.* Dec;56(6):652-64.
- 26 Forsberg G, Hernell O, Melgar S, et al. (2002) Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology.* Sep;123(3):667-78
- 27 Maiuri MC, De Stefano D, Mele G, et al. (2003) Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-gamma-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF-kappa B. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jul;368(1):63-71.
- 28 Sato N, Patel HJ, Waldmann TA, et al. (2007) The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 9;104(2):588-93

# CAPÍTULO VI

## MENORES NIVELES DE CÉLULAS *i*NKT EN PACIENTES REFRACTARIOS

*Manuscrito publicado:*

**David Bernardo**, Ingrid M.W. van Hoogstraten, Wieke H.M. Verbeek, A. Salvador Peña, M. Luisa Mearin, Eduardo Arranz, José Antonio Garrote, Rik J. Scheper, Marco W.J. Schreurs, Hetty J. Bontkes, Chris J.J. Mulder, B. Mary E. von Blomberg (2008) Decreased circulating *i*NKT cell numbers in Refractory Coeliac Disease. Clin Immunol. 2008 Feb;126(2):172-9.



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía causada por la ingesta de gluten en individuos genéticamente susceptibles (1) que conduce a la lesión de la mucosa del intestino delgado. Esta lesión está caracterizada por una hiperplasia de las criptas, aplanamiento de las vellosidades y un incremento de los linfocitos intraepiteliales (LIEs). El único tratamiento disponible en la actualidad es la dieta estricta sin gluten para toda la vida (DSG), tras la cual se observa una completa remisión de la sintomatología y una recuperación de la lesión mucosa del intestino delgado. Sin embargo, una pequeña proporción de pacientes con EC refractaria (ECR) no responden positivamente a la DSG (2). La ECR está caracterizada por una respuesta inmunológica descontrolada, e independiente del gluten, en el intestino delgado. Como consecuencia, los IELs pueden incrementar la reprogramación de tipo NK (*NK-like*) (3), induciendo una respuesta inmune exacerbada de forma independiente al receptor de las células T (TCR), con una alta citotoxicidad y producción de IFN $\gamma$ . Adicionalmente, en algunos casos puede incluso llegar a surgir una población de IELs aberrantes, caracterizada por la falta de expresión de CD3 y CD8 en la superficie (ECR tipo II), que se asocia a un alto riesgo de desarrollar un linfoma intestinal asociados a las células T. Por el contrario, los pacientes sin estas células aberrantes, o que las presentan en un porcentaje menor al 20% (ECR tipo I), presentan un pronóstico mejor (2,4)

Las células T reguladoras (Treg; CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y factor de transcripción intracelular *Forkhead Box P3*<sup>+</sup> (FoxP3<sup>+</sup>)), NKT invariantes (iNKT; CD3<sup>+</sup> y TCR V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11<sup>+</sup>), y en menor medida, los linfocitos TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (T $\gamma\delta$ ; CD3<sup>+</sup>, TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>), son las principales poblaciones celulares encargadas de mantener la función de homeostasis inmunológica (5, 6, 7, 8, 9, 10). Las células Treg realizan su función al inhibir la proliferación de células T y la producción de IL-2 (11, 12, 13). Por su parte, los linfocitos intraepiteliales T $\gamma\delta$ , juegan un papel clave en la tolerancia oral al ser capaces de inducir la población de células Treg (9, 14). Así, tras la activación secundaria al reconocimiento de antígeno vía TCR, las células T $\gamma\delta$  pueden expresar de forma transitoria el receptor CCR7 para migrar a los nódulos linfáticos. Una vez allí, desarrollan la función presentadora de antígeno, e inducen la proliferación y diferenciación de las células Treg a partir de los linfocitos vírgenes (15).

Las células iNKT humanas expresan marcadores clásicos de células NK junto con un receptor TCR invariante (V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11<sup>+</sup>) que reconoce antígenos presentados

en el contexto de la molécula de tipo MHC-I, Cd1d (13, 16, 17, 18, 19). Estas células pueden, a su vez, subdividirse en las poblaciones CD4+ y CD4- (la mayoría de las cuáles serán CD4- CD8-). Mientras que la población doble negativa produce predominantemente un perfil tipo TH1 con predominio de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , las población CD4+ puede producir citocinas tanto TH1 como TH2 (IL-4 e IL-13) (20,8). Debido a este papel dual para producir grandes cantidades de citocinas TH1 (IFN $\gamma$ ) y TH2 (IL-4) tras su estimulación (21,22), esta población de células iNKT podría jugar un papel clave tanto en la protección contra tumores como en la prevención de las enfermedades autoinmunes (18, 23, 24).

Pese a que las células iNKT, T $\gamma\delta$  y Treg circulantes se encuentran en un número bajo (aproximadamente, el 0,02-0,2% de las células CD3+ circulantes son iNKTs (24), 2-10% de las células CD3+ son T $\gamma\delta$  (15) y el 2-5% de las células CD4+ son Treg (11)), se ha descrito ampliamente un drástico descenso de estas células homeostáticas tanto en enfermedades autoinmunes como neoplásicas (18, 23, 25, 26, 27). En el caso de la EC, se han descrito reducciones en los niveles circulantes tanto de células iNKT como de T $\gamma\delta$ + (28, 29). Sin embargo, ninguno de estos estudios se había llevado a cabo considerando el desarrollo de un proceso autoinmune descontrolado como el que caracteriza a la ECR, o considerando incluso el desarrollo de linfomas intestinales asociados a los pacientes ECR tipo II. De hecho, y dado que las células iNKT pueden tener tanto efector regulador como pro-inflamatorio, el estudio en paralelo de las proteínas asociadas con la función reguladora, como FoxP3 y CTLA4 en dicha población, podría aportar nueva información en el estudio de los mecanismos de la función reguladora.

La hipótesis propuesta en este capítulo es doble. Por una parte, se plantea que la falta de un número adecuado de células reguladoras circulantes (incluyendo a las células iNKT CD4+, Treg y T $\gamma\delta$ ) es un factor predisponente en el desarrollo de la ECR. Por otra, se pretende estudiar si los pacientes con EC, tanto en actividad como tratados con DSG, presentan un déficit de estas células, comparado con los pacientes control sanos no-EC, que permita comprender por qué la primera señal inmune desencadenada por el gluten en todos los individuos es más funcional y lleva al desarrollo de la enteropatía únicamente en los pacientes EC susceptibles. Con este propósito, se estudiaron los niveles circulantes de las células homeostáticas mencionadas en un grupo de pacientes con ECR (tipo I, y tipo II), pacientes con EC

en actividad (sin tratar) y con DSG, y en un grupo de pacientes control no-EC sanos. Además, se estudió la carga intracelular de las proteínas reguladoras CTLA4 y FoxP3 en la población de células iNKT.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

En este capítulo se estudiaron un total de 137 pacientes con EC, de los cuáles 28 estaban sin tratar (edad media 26,5 años, rango 1-75 años, 36% varones), 80 respondían a la DSG (edad media 38,2 años, rango 3-76 años, 22% varones) y 29 eran ECR que no respondían a la DSG (edad media 57,5 años, rango 45-68 años, 38% varones), así como 73 individuos voluntarios sanos sin ninguna enfermedad autoinmune o neoplásica conocida al momento de la extracción de sangre (edad media 32,2 años, rango 2-82 años, 36% varones). Los pacientes con ECR, fueron a su vez sub-divididos en ECR tipo I (14 pacientes, edad media 57,5 años, rango 47-68 años, 36% varones) y ECR tipo II (15 pacientes, edad media 60,6 años, rango 47-68 años, 39% varones) atendiendo a la ausencia y presencia (>20% de IELs), respectivamente, de linfocitos aberrantes en el compartimento intraepitelial.

### **Análisis por citometría de células de sangre periférica**

Las células mononucleares de sangre periférica fueron separadas según el protocolo de Ficoll previamente descrito y criopreservadas en nitrógeno líquido hasta su caracterización por citometría de flujo en un equipo FACSCalibur (BD Biosciences). Las células iNKTs fueron identificadas por la co-expresión de CD3 (APC-marcado, BD Biosciences), V $\alpha$ 24 (FITC-marcado, Immunotech) y V $\beta$ 11 (PE-marcado, Immunotech). Los niveles intracelulares de CTLA4 (APC-marcado, BD Biosciences) y FoxP3 (APC-marcado, eBioscience) fueron también determinados en las células iNKT, conjuntamente con la expresión superficial de CD4 (PerCP-marcado, BD Biosciences). Las células Treg fueron identificadas por la coexpresión de CD3 (PerCP-marcado, BD Biosciences), CD4 (FITC-marcado) y alta expresión de CD25 (APC-marcado, BD Biosciences), conjuntamente con la expresión intracelular de FoxP3 (PE-marcado, eBioscience). Las células T $\gamma\delta$  fueron identificadas por la coexpresión de CD3 (PerCP-marcado) y TCR  $\gamma\delta$  (PE-marcado). En todos los casos se usaron los controles de isotipo apropiados. Debido a los pequeños porcentajes en que estas células pueden presentarse en la sangre periférica, se adquirieron un mínimo de 100.000 linfocitos vivos (atendiendo a la configuración de tamaño y complejidad) para medir correctamente sus niveles.



**Análisis estadístico**

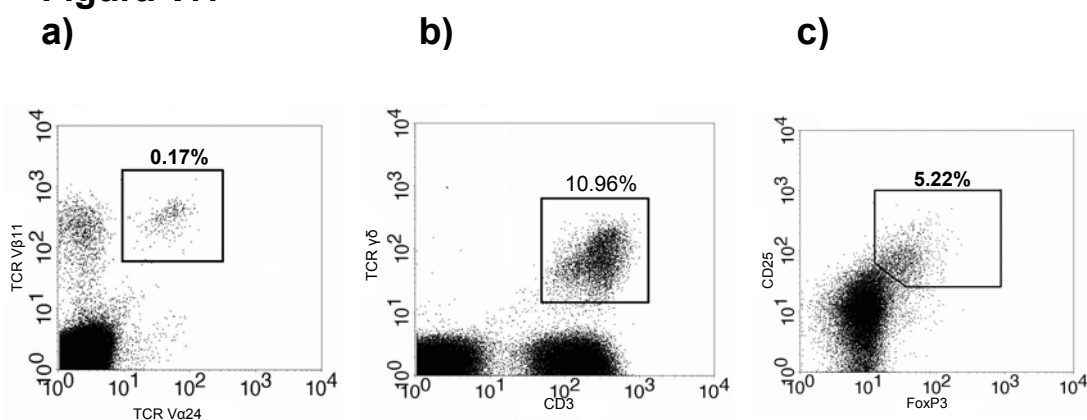
Se realizaron análisis de correlación y análisis no paramétricos de 2 colas con los tests Kruskal-Wallis y el test U de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados como el límite de significación.

## RESULTADOS

## Análisis fenotípico de las células T homeostáticas

En la figura VI.1 se representa el análisis de la determinación fenotípica de las células iNKT, Treg y  $T\gamma\delta$ . Los linfocitos vivos fueron identificados atendiendo a las características de tamaño y complejidad. A menos que se especifique lo contrario, los niveles de células iNKT, Treg y  $T\gamma\delta$  se muestran como el % del total de linfocitos circulantes CD3+.

Figura V.1



Análisis de las células reguladoras circulantes de un donante representativo. Los linfocitos vivos fueron identificados atendiendo a la forma y morfología.

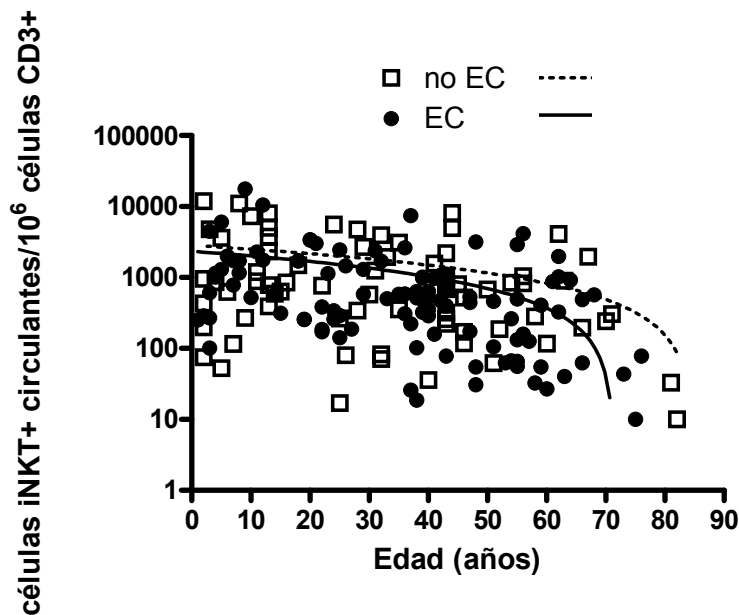
a) Análisis de células iNKT. Ejemplo de tinción de linfocitos de sangre periférica con una tinción Vα24 y Vβ11, realizada dentro de los linfocitos CD3+. Las células iNKTs fueron identificadas como CD3+ Vα24+ y Vβ11+

b) Análisis de células TCR  $T\gamma\delta$ +. Ejemplo de tinción de linfocitos de sangre periférica con una tinción  $T\gamma\delta$  y CD3. Las células TCR  $T\gamma\delta$  fueron definidas como CD3+ y  $T\gamma\delta$ +

c) Análisis de células Treg. Ejemplo de tinción de células linfocitos de sangre periférica con una tinción CD25+ y FoxP3 intracelular realizada en células CD3+CD4+. Las células Treg fueron definidas como CD3+ CD4+ CD25alto y FoxP3+ intracelular.

Debido a la conocida influencia de la edad sobre los niveles de algunos tipos de células T (31), y que incluso podrían estar influidos por el género, se realizaron análisis de regresión lineal. En ningún caso se encontró un efecto derivado del género en ninguna sub-población celular, mientras que se encontró un descenso asociado a la edad en las frecuencias de las células iNKTs, tanto en los pacientes control sanos como en los pacientes con EC (Figura VI.2).

Figura VI.2



Efecto de la edad en las frecuencias de las células iNKT circulantes en individuos control sanos sin enfermedades autoinmunes ni malignificaciones conocidas (no-EC) y en pacientes celíacos (EC). La gráfica representa una reducción dependiente de la edad en ambos grupos, tanto EC como controles no-EC

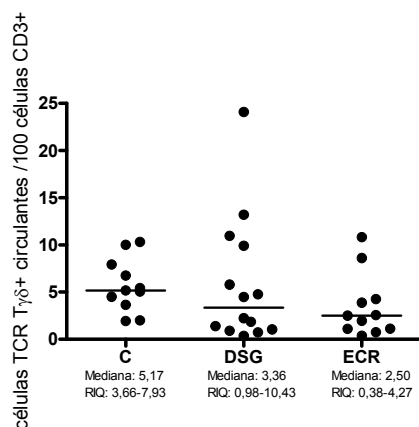
Va24 $\alpha$ Vb11 $\beta$  células iNKT /106 células T en controles (r de Spearman  $r = -0,238$ ,  $p = 0,0430$ ) y en pacientes EC (r de Spearman  $r = -0,4104$ ,  $p < 0,0001$ ).

### Los pacientes con EC y ECR tienen niveles normales de células T $\gamma\delta$ y Treg circulantes

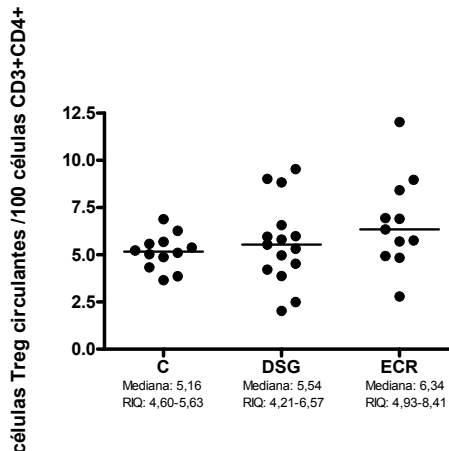
No se encontraron diferencias significativas en los niveles circulantes de células T $\gamma\delta$  entre pacientes con EC que respondían a la DSG, pacientes con ECR y los controles sanos (Figura VI.3a). Los niveles de células Treg circulantes fueron determinados tanto dentro de la subpoblación CD3+CD4+ (Figura VI.3b), como en el total de células CD3+ circulantes ((Figura VI.3c). En ningún caso se encontraron diferencias en las frecuencias de esta población Treg entre los grupos estudiados. Finalmente, y dentro del grupo de pacientes ECR, no se encontró correlación entre los niveles circulantes de estas células homeostáticas Treg y T $\gamma\delta$ , y el porcentaje de linfocitos aberrantes del compartimento intraepitelial (datos no mostrados).

Figura VI.3

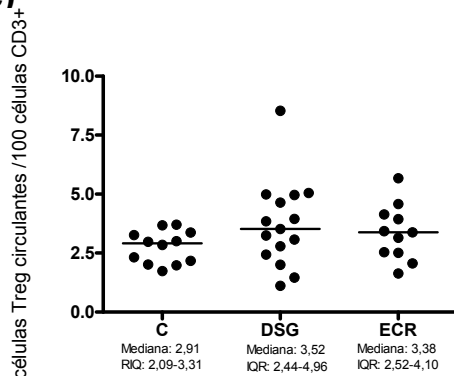
a)



b)



c)

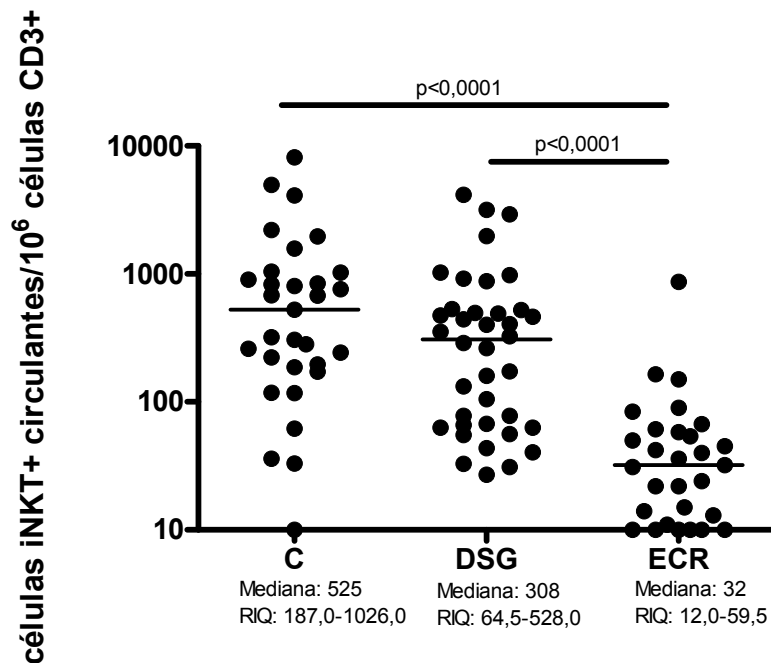


Porcentajes de células T $\gamma\delta$ + y Treg circulantes en sangre periférica de individuos controles sanos sin enfermedades autoinmunes ni malignificaciones conocidas (C) y en pacientes EC, tanto respondedores a la DSG (DSG) como refractarios no respondedores (ECR). a) células T $\gamma\delta$ + dentro de la población CD3+, b) células Treg dentro de la población CD3+CD4+ y c) dentro de la población CD3+. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (Kruskal-Wallis,  $p=0,1910$ ,  $p=18,04$  y  $p=0,2185$  respectivamente). Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico.

### Las células iNKTs se encuentran disminuidas en los pacientes con ECR

Para comparar las frecuencias de las células iNKTs en los pacientes con ECR, que tenían en general mayor edad que el grupo control (edad media 57,5 años, rango 45-68 años), estos fueron comparados con las frecuencias de un grupo de pacientes con EC que respondían a la DSG (38 individuos, edad media 55,3 años, rango 41-76 años) y controles sanos no-EC (31 individuos, edad media 53,8 años, rango 41-82 años) para corregir el efecto que la edad ejerce sobre los niveles circulantes de estas células (Figura VI.2). La Figura VI.4 muestra que la población de células iNKTs se encontró ampliamente reducida en los pacientes con ECR, al comparar tanto a los pacientes con EC que respondían a la DSG como con los individuos controles sanos.

Figura VI.4

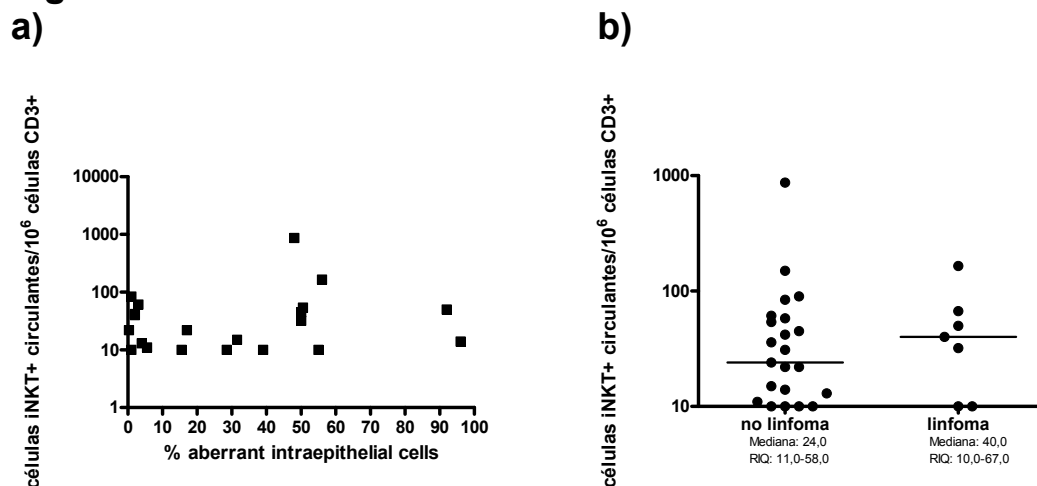


Células iNKT circulantes por millón de células CD3+ circulantes en pacientes EC respondedores (DSG) y no respondedores (ECR), y en individuos controles sanos sin enfermedades autoinmunes ni malignificaciones conocidas (c) (mayores de 40 años). Se representan las diferencias estadísticamente significativas (test U de Mann-Whitney) (test Kruskal-Wallis  $p < 0,0001$ ). Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico

### La reducción de células iNKT no está relacionada con la presencia de células aberrantes intraepiteliales o el desarrollo de linfoma intestinal

Para investigar si la disminución de los niveles de células iNKT encontrados en los pacientes con ECR podría estar asociada con un potencial estado pre-maligno, se compararon los valores circulantes de las células homeostáticas con el porcentaje de células aberrantes (CD3- en superficie y CD3+ intracelular) entre los LIEs (Figura VI.5a). No se encontró correlación entre ambos parámetros y, por tanto, tampoco se encontraron diferencias en los niveles circulantes de las células iNKT entre los pacientes con ECR tipo I y los tipo II (ECR tipo I: mediana 33,5, RIQ 10,5-59,5; tipo II: mediana 32,0, RIQ 13,0-67,0). De hecho, los niveles de células iNKT no se encontraron ni siquiera más disminuidos en los pacientes con ECR que desarrollaron linfoma intestinal de células T (Figura VI.5b)

Figura VI.5



No se encontró relación entre las frecuencias de células iNKT circulantes y los niveles de linfocitos aberrantes intraepiteliales o el desarrollo de linfomas intestinales de células T en los pacientes refractarios.

a) Niveles de células iNKT circulantes y porcentaje de linfocitos aberrantes (CD3- superficie, CD3+ intracelular) intraepiteliales ( $r$  de Spearman = 0,2177,  $p=0,3303$ ) y b) comparación de los niveles circulantes de células iNKTs entre pacientes ECR con y sin el desarrollo de linfoma (test U de Mann-Whitney,  $p=0,6588$ ).

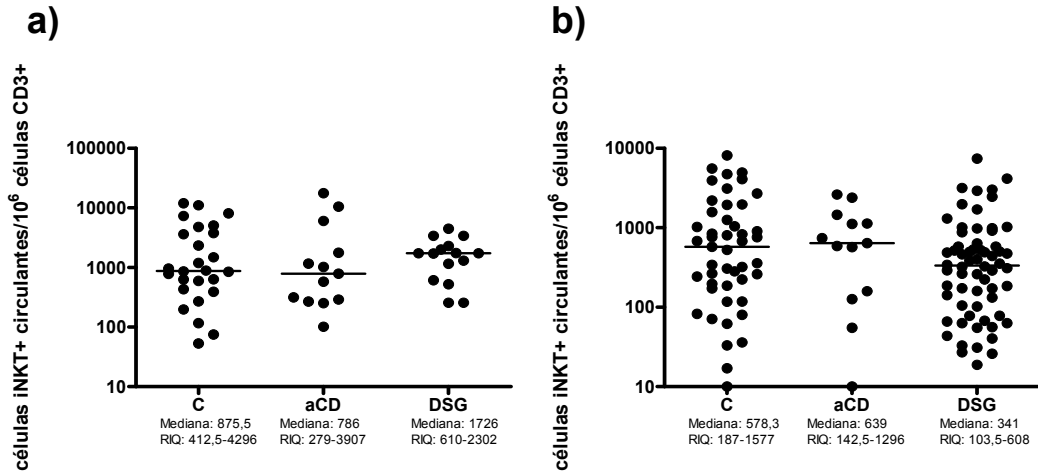
Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico

### Las células iNKT circulantes presentan valores normales en los pacientes con EC, tanto en actividad como tratados con DSG

Se estudió a continuación hasta qué punto el déficit de células iNKT era característico de los pacientes con ECR, o si los pacientes con EC en fase de actividad tenían reducidos los niveles de células iNKT (como ha sido sugerido recientemente por Grose et al, 28), lo cuál podría ser un factor predisponente más en la falta de control de la respuesta inmune innata desencadenada por la gliadina en todos los individuos como se ha visto en el capítulo IV. Para ello, se evaluaron los niveles de dichas células por separado, tanto en niños/adolescentes (menores de 20 años) como en adultos (mayores de 20 años), tras confirmar que no se encontraba una depleción en estas células en los primeros 20 años de vida (individuos controles sanos;  $r$  de Spearman = 0,1526,  $p=0,4567$ ; EC:  $r$  de Spearman = 0,2539,  $p=0,1924$ ). Tanto los niños/adolescentes tratados y sin tratar (Figura VI.6a), como los pacientes adultos (Figura VI.6b), mostraron niveles normales de células iNKT en comparación con los respectivos controles sanos. Dado que se encontraron amplias diferencias individuales en la carga de estas células, 4 pacientes con niveles bajos, intermedios y altos de células iNKT fueron estudiados en profundidad, a los que se les hizo un seguimiento longitudinal desde la fase de actividad de la EC hasta un año después

del inicio de la DSG. En todos estos pacientes, los niveles de células iNKT se mantuvieron estables a lo largo de todo el proceso (datos no mostrados).

**Figura VI.6**

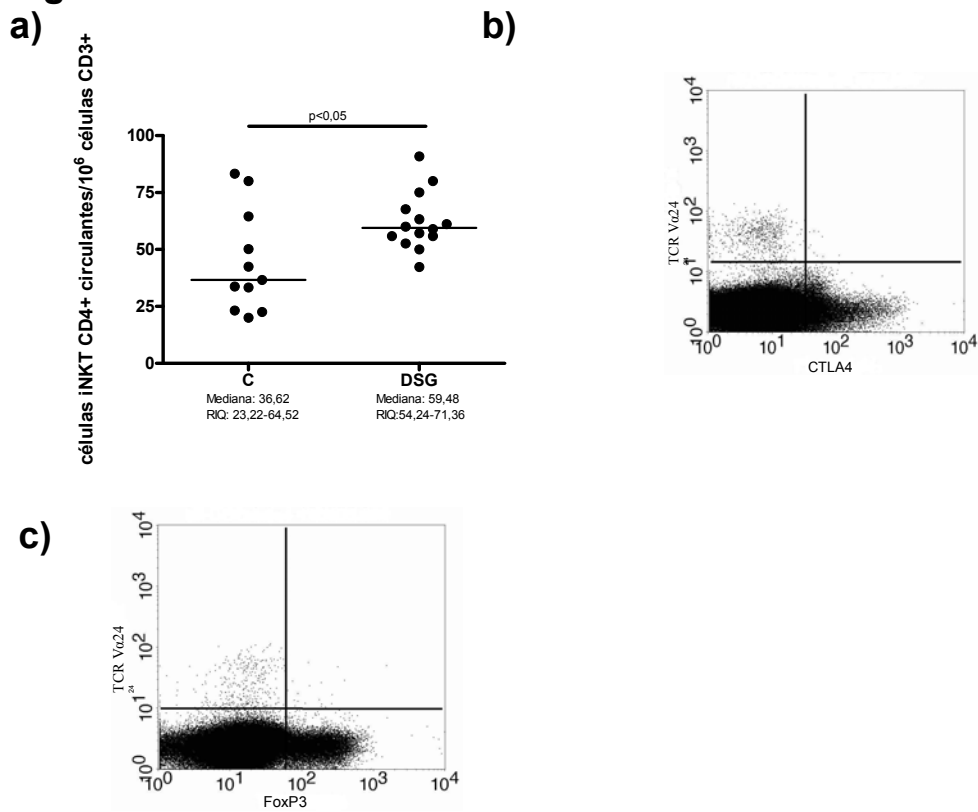


Frecuencia de células iNKT circulantes (número de células iNKT por millón de células CD3+ circulantes) en sangre periférica de individuos controles sanos sin enfermedades autoinmunes ni malignificaciones conocidas (C), pacientes EC en actividad (aCD) y pacientes EC respondedores a la DSG (DSG). a) niños/adolescentes menores de 20 años y b) adultos mayores de 20 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (test Kruskal-Wallis,  $p=0,07008$  y  $p=0,1467$  respectivamente). Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico

### Fenotipo regulador de las células iNKT en la EC

Pese a que la carga de células iNKT circulantes no se encontró modificada en los pacientes con EC, ni en actividad ni tratados, a continuación se estudió hasta qué punto la subpoblación de células iNKT reguladoras (CD4+) podía estar afectada en los pacientes con EC. Desafortunadamente, los niveles de células iNKT fueron tan sumamente bajos en los pacientes con ECR que no fue posible realizar este abordaje en los mismos, no pudiéndose estudiar su fenotipo de forma precisa. Se comparó, por tanto, el fenotipo CD4+/- de las células iNKT además de la expresión de las moléculas reguladoras asociadas FoxP3 y CTLA4 en los pacientes con EC que respondían a la DSG, y en un grupo de pacientes control sanos. Los pacientes con EC mostraron una proporción mayor de células iNKT CD4+ (Figura VI.7a) que los pacientes control sanos. Respecto a la expresión de las moléculas asociadas a las células Treg, la Figura VI.7b y VI.7c muestra que las células iNKT circulantes, tanto de pacientes con EC, como de los controles sanos, no expresan las moléculas reguladoras CTLA4 ni FoxP3, con independencia de la expresión de CD4.

Figura VI.7



Análisis del fenotipo de las células iNKT. a) porcentaje de células iNKT CD4+ en sangre periférica de pacientes EC respondedores a la DSG (DSG) y de individuos controles sanos sin enfermedad autoinmunes ni malignificaciones conocidas (C) (test U de Mann-Whitney, p= 0,0375).

Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico  
 b) Tinción intracelular de CTLA4 y c) FoxP3 en células iNKT.



**DISCUSIÓN**

Las células iNKT son muy importantes tanto en la vigilancia inmune como en la regulación de las enfermedades autoinmunes (7,23). Esto no es sólo apoyado por los déficits de estas células tanto en enfermedades autoinmunes como neoplásicas (17,25), o porque sean incluso capaces de proteger frente a la diabetes tipo I en ratones NOD tras interactuar con las células Treg (32), sino también porque se ha observado una asociación entre un número reducido de células iNKT y un peor pronóstico en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (24). Sin embargo, se debate aún si la falta de un número adecuado de células iNKT representa un factor de riesgo o, por el contrario, es una consecuencia de la enfermedad. En este sentido, los pacientes con EC representan un grupo de estudio ideal ya que pueden expresar todo el espectro patogénico posible, variando desde un estado de hipersensibilidad al gluten con atrofia reversible de las vellosidades, hasta un mecanismo autoinmune independiente del gluten en los pacientes con ECR, y dentro de este grupo, el tipo I, con un relativamente buen pronóstico, por oposición al tipo II, donde hay una alta incidencia de malignización de la enfermedad que puede derivar en un linfoma intestinal de células T.

Los resultados aquí obtenidos son compatibles con la hipótesis de que las células iNKT pueden prevenir la progresión de la enfermedad hacia un estado refractario. Sin embargo, para evaluar si un defecto en los niveles de estas células puede preceder realmente a un estado refractario, se debería realizar un seguimiento de los pacientes con EC en DSG y niveles escasos de células iNKT, para evaluar correctamente el riesgo a largo plazo a desarrollar la ECR. Dado que sólo una pequeña proporción de pacientes en DSG desarrollan este estado, esta aproximación no parece ser demasiado útil. Por el contrario, a la vista de nuestros resultados, parece claro que debe haber otros factores predisponentes para el desarrollo de la condición de ECR, ya que la mayoría de los pacientes en DSG con bajos niveles de células iNKT presentaban una buena respuesta al tratamiento.

Para valorar el riesgo a progresar desde la condición refractaria hasta el desarrollo de un linfoma intestinal, se estudió también la posible implicación de los niveles bajos de estas células homeostáticas con la presencia de IELs aberrantes, una característica de los pacientes con ECR tipo II que parece estar asociada con una menor esperanza de vida (30). Sin embargo, no se pudo confirmar esta relación en nuestras muestras, probablemente debido al escaso número de células iNKTs, en

muchos casos indetectable, que caracteriza a los pacientes con ECR. De hecho, ni siquiera en los pacientes que desarrollaron un linfoma intestinal de células T pudo apreciarse una reducción mayor de las células iNKT circulantes. En cualquier caso, nuestros datos apuntan a que los niveles reducidos de estas células en los pacientes con ECR predispone, o al menos refleja, un estado progresivo de destrucción autoinmune, ya que por el contrario, los pacientes con EC no tratados (en actividad), tanto niños como adultos, presentaban niveles normales de células iNKT comparables con los encontrados en el grupo control sano. Estos resultados concuerdan con otros previamente publicados (17), aunque contradicen los publicados recientemente por Grose et al (28), quienes han descrito un déficit numérico y funcional de células iNKT en los pacientes con EC, tanto en actividad como tratados, que iba incluso acompañado de una reducción en los niveles de células en la mucosa del intestino. Sin embargo, no está claro que puede haber originado esta discrepancia, ya que tanto este estudio como el de Grose et al (28) incluyeron un gran número de pacientes en cada grupo, además de utilizar controles sanos agrupados por edad, y una metodología similar. Además, la población CD3+V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ ha sido evaluada también en varios estudios clínicos, encontrándose correlaciones elevadas entre estas células y los niveles de detección de las células iNKT mediante tetrámeros  $\alpha$ GalCer/CD1d (33). De hecho, Grose et al (28) detectaron una reducción del total de células doble positivas V $\alpha$ 24+ V $\beta$ 11+, confirmando, por tanto, que la discrepancia entre los datos no puede ser debida a diferencias metodológicas. La única diferencia entre ambos estudios parece deberse al análisis estadístico, ya que en este trabajo, las células iNKT no presentaban una distribución normal y por ello se realizaron análisis no-paramétricos, mientras que en el trabajo de Grose et al (28), se aplicó una estadística paramétrica. Finalmente, y para dar más consistencia a nuestros resultados, todos los datos fueron evaluados mediante una estadística robusta paramétrica 0,2-recortada para eliminar el efecto de los valores extremos de la muestra (más fiable que la estadística no-paramétrica (34)), obteniéndose resultados similares a los comentados previamente en todos los casos (datos no mostrados), que confirmaban así la fiabilidad de nuestros resultados. Queda por saber si la co-existencia de otras enfermedades autoinmunes, como enfermedad de Crohn y/o Colitis Ulcerosa, que se sabe reducen los niveles circulantes de células iNKT (17, 27), y excluidas de nuestro estudio, podrían haber

estado incluídas en el estudio de Grose et al, explicando así la discrepancia de los datos.

Finalmente, se evaluó también el fenotipo de las células iNKT como apoyo a su función reguladora. Desafortunadamente, y una vez más debido al escaso número de células detectadas en los pacientes con ECR, este análisis no pudo ser realizado en estos pacientes de forma precisa. Curiosamente, los pacientes con EC que respondían a la DSG mostraron una mayor frecuencia de células iNKT CD4+ que la encontrada en el grupo control sano. Es interesante señalar también que se ha descrito previamente un aumento de los niveles de células Treg específicas de gliadina en los pacientes con EC en DSG (35), apuntando así a que los pacientes con niveles más elevados de estas células responden a la dieta y, por tanto, no desarrollan la ECR o, más probablemente, que estas células aumentan a lo largo del tratamiento. Es también remarcable que no se encontró apoyo molecular a la función reguladora de las células iNKT CD4+, ya que no se detectó expresión intracelular ni de FoxP3 ni de CTLA4 (ni siquiera en la subpoblación CD4-). Esto podría sugerir mecanismos reguladores diferentes para las células iNKT y las células Treg, aunque no debe olvidarse que este estudio se realizó en células iNKT quiescentes, por lo que estos mecanismos reguladores podrían inducirse tras la activación celular.

El tratamiento de la ECR implica generalmente el uso de fármacos inmunoreguladores (36, 37, 38) y, en el caso de los pacientes con ECR de tipo II, quimioterapia y trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (39). Sin embargo, ninguna de estas aproximaciones es realmente efectiva, por lo que podría ser de vital importancia el desarrollo de nuevas terapias que ayudasen a recuperar la homeostasis del sistema inmune. Recientemente, Gianfrani et al (35) sugirió una posible aproximación terapéutica basada en la expansión *in vitro* de las células Treg específicas de gliadina, tras la inducción de su capacidad de migración al intestino para ser reintroducidas en los pacientes con ECR y ayudar a controlar la autoinmunidad. Dado que en este capítulo se ha demostrado una depleción selectiva de células iNKT en la ECR, estas nuevas estrategias terapéuticas deberían considerar también la reconstitución de la población de células iNKT en número adecuado, y apropiadamente polarizada (23).

Respecto a los niveles circulantes de las otras células homeostáticas estudiadas, células Treg y T $\gamma\delta$ , no se encontraron déficits en su expresión en ningún tipo de paciente con EC. Además, tampoco se encontraron diferencias entre los

pacientes con ECR de tipo I y II. Se considera que las células Treg, al igual que las iNKT, tienen la capacidad de prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Además, los tumores se podrían beneficiar de individuos con niveles escasos de estas células que implicasen así una respuesta anti-tumoral menos efectiva (40). A pesar de los niveles normales encontrados en la circulación, no se puede excluir la posibilidad de que exista un déficit de dichas células homeostáticas en la mucosa. Es sabido que los pacientes con EC se caracterizan por un infiltrado permanentemente elevado de LIEs TCR $\gamma\delta$ , junto con la infiltración de células TCR $\alpha\beta$ +, en la fase activa de la enfermedad (41, 42, 43). Sin embargo, los niveles de células TCR $\alpha\beta$ + disminuyen en respuesta a la retirada del gluten, mientras que las células TCR $\gamma\delta$ + permanecen elevadas durante largos periodos de tiempo (44). En la mucosa de los pacientes con EC en remisión se ha descrito un número relativamente alto de células T $\gamma\delta$  (45,46) y, recientemente, también de células Treg específicas de gliadina (35). Además, es conocido que las células Treg son capaces de controlar el desarrollo de la enfermedad en otras enfermedades intestinales como la Colitis Ulcerosa (47). Por tanto, en un futuro se debe evaluar no sólo la expresión de las células iNKT de la mucosa intestinal, sino también de las células Treg y T $\gamma\delta$ , para comprender mejor los mecanismos que subyacen en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la desregulación que parece tener lugar en los pacientes con ECR.

En resumen, en este capítulo se demuestra que de todas las células homeostáticas circulantes estudiadas, sólo la población iNKT aparece reducida selectivamente en los pacientes con ECR, en comparación a los pacientes con EC que responden a la DSG. Por tanto, nuevas estrategias terapéuticas basadas en la expansión de las células iNKT polarizadas adecuadamente (23) deberían ser tenidas en cuenta como una alternativa para prevenir el desarrollo de procesos autoinmunes en los pacientes con ECR.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Maki M, Collin P. (1997) Coeliac disease. *Lancet*. Jun 14;349(9067):1755-9
- 2 Daum S, Cellier C, Mulder CJ. (2005) *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Jun;19(3):413-24
- 3 Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee L, Tretiakova M, Semrad C, Kistner E, Winchester RJ, Braud V, Lanier LL, Geraghty DE, Green PH, Guandalini S, Jabri B. (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. May 15;203(5):1343-55.
- 4 Al-Toma A, Verbeek WH, Mulder CJ. (2007) Update on the management of refractory coeliac disease. *J Gastrointest Liver Dis*. Mar;16(1):57-63.
- 5 Villarrubia N, Leon F, Bootello A. (2002) T gamma-delta lymphocytes and their role in hypersensitivity processes in the digestive and respiratory mucosa. *Allergol Immunopathol Sep-Oct*;30(5):273-82
- 6 Battaglia A, Di Schino C, Fattorossi A, Scambia G, Evoli A. (2005) Circulating CD4+CD25+ T regulatory and natural killer T cells in patients with myasthenia gravis: a flow cytometry study. *J Biol Regul Homeost Agents*. Jan-Jun;19(1-2):54-62
- 7 Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Eloi-Santos SM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes *Scand J Immunol*. Sep;62(3):297-308
- 8 La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi. (2006) CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators *Trends Immunol*. Jul;27(7):322-7
- 9 Locke NR, Stankovic S, Funda DP, Harrison LC (2006) TCR gamma delta intraepithelial lymphocytes are required for self-tolerance. *Immunol*. Jun 1;176(11):6553-9.
- 10 van Dieren JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Escher JC, Samsom JN, Blumberg RS, Nieuwenhuis EE. (2007) Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis*. May 2; [Epub ahead of print]
- 11 Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolle PA, Thomas RK, von Bergwelt-Baildon M, Debey S, Hallek M, Schultze JL. (2005) Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. Sep 15;106(6):2018-25
- 12 Thornton AM, Shevach EM. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.
- 13 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. (2001) Control of T-cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*. Aug;182:58-67.
- 14 Thielke KH, Hoffmann-Moujahid A, Weisser C, Waldkirch E, Pabst R, Holtmeier W, Rothkotter HJ. (2003). Proliferating intestinal gamma/delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma/delta T cell pool in the peripheral blood. *Eur J Immunol*. Jun;33(6):1649-56.
- 15 Brandes M, Willmann K, Moser B. (2005) Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*. Jul 8;309(5732):264-8.
- 16 Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. 2000 NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*. Nov;21(11):573-83
- 17 van der Vliet HJ, von Blumberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM. (2001)

Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol.* Aug;100(2):144-8

18 Yu KO, Porcelli SA. (2005) The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett.* Aug 15;100(1):42-55.

19 Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, Kronenberg M. (2000) Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med.* Sep 4;192(5):741-54.

20 Cardell SL. (2006) The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol.* Feb;143(2):194-202.

21 Chen H, Huang H, Paul WE. (1997) NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation. *J Immunol.* Jun 1;158(11):5112-9.

22 Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. (1997) Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med.* Jul 7;186(1):109-20.

23 van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Nishi N, Kolgen W, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. (2004) The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol.* Jul; 112(1):8-23.

24 Molling JW, Langius, JAE, Langendijk, JA, Leemans, CR, Bontkes, HJ, van der Vliet, HJJ, von Blomberg, BME, Scheper, RJ, van den Eertwegh, AJM. (2007) Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol;* Mar 1;25(7):862-8.

25 Molling JW, Kolgen, W, van der Vliet, HJ, Boomsma, MF, Kruizenga, H, Smorenburg, CH, Molenkamp, BG, Langendijk, JA, Leemans, CR, von Blomberg, BM, Scheper, RJ, van den Eertwegh, AJ. (2005) Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer;*116:87-93.

26 Oh U, Grant C, Griffith C, Fugo K, Takenouchi N, Jacobson S. (2006) Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during human t lymphotropic virus type 1 Infection. *J Infect Dis.* Jun 1;193(11):1557-66

27 Grose RH, Thompson FM, Baxter AG, Pellicci DG, Cummins AG. (2007) Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* Jun;52(6):1415-22.

28 Grose RH, Cummins AG, Thompson FM (2007) Deficiency of invariant NK T-cells in coeliac disease *Gut.* 56: 790-795

29 Kerttula TO, Holm K, Partanen J, Polvi A, Maki M. (1998) Circulating T lymphocyte subsets in coeliac disease (CoD) patients and healthy family members. *Clin Exp Immunol.* Mar;111(3):536-40.

30 Al-Toma A, Verbeek WH, Hadithi M, von Blomberg BM, Mulder CJ. (2007) Survival in Refractory Coeliac Disease and Enteropathy associated T cell Lymphoma: Retrospective evaluation of single centre experience. *Gut.* May 9; [Epub ahead of print]

31 Peralbo E, Alonso C, Solana R. (2007) Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: Two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. *Exp Gerontol.* 2007 Aug;42(8):703-8.

32 Ly D, Mi QS, Hussain S, Delovitch TL. (2006) Protection from type 1 diabetes by invariant NK T cells requires the activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006 Sep 15;177(6):3695-704.

33 Veldt BJ, van der Vliet HJ, von Blomberg BM, van Vlierberghe H, Gerken G, Nishi N, Hayashi K, Scheper RJ, de Knegt RJ, van den Eertwegh AJM, Janssen HLA, Nieuwkerk CMJ (2007) Randomized placebo controlled phase I/II trial of  $\alpha$ -galactosylceramide for the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* Sep;47(3):356-65.

- 34 García Perez A. On robustness for hypotheses testing. *International Statistical Review*. 1993 61:369-85.
- 35 Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. (2006) Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*. Sep 15;177(6):4178-86.
- 36 Goerres MS, Meijer JW, Wahab PJ, Kerckhaert JA, Groenen PJ, Van Krieken JH, Mulder CJ. (2003) Azathioprine and prednisone combination therapy in refractory coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Sep 1;18(5):487-94.
- 37 Vivas S, Ruiz de Morales JM, Ramos F, Suarez-Vilela D. (2006) Infliximab in refractory coeliac disease. *N Engl J Med*. Jun 8;354(23):2514-5.
- 38 Al-Toma A, Goerres MS, Meijer JW, von Blomberg BM, Wahab PJ, Kerckhaert JA, Mulder CJ. (2006) Cladribine therapy in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Clin Gastroenterol Hepatol*. Nov;4(11):1322-7
- 39 Al-toma A, Visser OJ, van Roessel HM, von Blomberg BM, Verbeek WH, Scholten PE, Ossenkoppele GJ, Huijgens PC, Mulder CJ. (2007) Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Blood*. Mar 1;109(5):2243-9
- 40 Wang HY, Wang RF. (2007) Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol*. Apr;19(2):217-23.
- 41 Halstensen TS, Scott H, Brandtzaeg P. (1989) Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand J Immunol*;30:665-672.
- 42 Savilahti E, Arato A, Verkasalo M. (1990) Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res*;28:579-581.
- 43 Robijn RJ, Logtenberg T, Wiegman LJ, van Berge Henegouwen GP, Houwen RW, Koningsberger JC. (1995) Intestinal T lymphocytes. *Scand J Gastroenterol Suppl*;212:23-33.
- 44 Iltanen S, Holm K, Ashorn M, Ruuska T, Laippala P, Maki M. (1999) Changing jejunal gamma delta T cell receptor (TCR)-bearing intraepithelial lymphocyte density in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1999;117:51-55.
- 45 Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. (1994) 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*. Apr;35(4):476-82.
- 46 Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H, Roy G. (2000) Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr*. Mar;89(3):285-90.
- 47 Izcue A, Coombes JL, Powrie F. (2006) Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev*. Aug;212:256-71.





# *CAPÍTULO VII*

## *MAYOR BALANCE DE iNKT/Treg EN EL DUODENO CELIACO*

*Manuscrito en preparación*



**INTRODUCCION**

La enfermedad celiaca (EC), es una hipersensibilidad del intestino delgado frente al trigo y otros cereales que contienen gluten (cebada, centeno y probablemente avena) en individuos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8) (1,2), cuyo único tratamiento es la dieta sin gluten (DSG) de por vida. En la EC, la inmunidad innata, mediada principalmente por la producción de IL-15 (3), juega un papel clave en el desencadenamiento de la inmunidad adaptativa, verdadera efectora de la lesión tisular, y caracterizada por un perfil TH1, con predominio de IFN $\gamma$ , aunque en ausencia de IL-12 (1,2).

Recientemente, nuestro grupo ha propuesto que el primer paso, es decir, el desencadenamiento de la inmunidad innata determinado por la producción de IL-15, no parece ser un fenómeno restringido únicamente a los pacientes EC (4), por oposición a la respuesta adaptativa secundaria. En los capítulos anteriores de esta tesis se proponía que la mayor densidad de receptores de IL-15 hallada en los pacientes EC podría facilitar un menor umbral de respuesta a dicha citocina en el duodeno celiaco. Adicionalmente, también se especulaba que quizás los pacientes EC tuviesen un fallo de células homeostáticas que no les permitiese controlar la respuesta innata, hecho que fue descartado mediante el análisis de células homeostáticas circulantes. Sin embargo, y pese a que no se encontraron diferencias en los niveles circulantes de células T $\gamma\delta$ +, es sabido que dichas células se mantienen elevadas en el duodeno celiaco, incluso tras el seguimiento de la de DSG (5,6). En consecuencia, se hace necesario un análisis del contenido en células homeostáticas de la mucosa duodenal para determinar si realmente en los pacientes EC pudiese haber un déficit en su expresión que contribuyese a facilitar el desencadenamiento de la pérdida de tolerancia oral al gluten.

Las células T reguladoras (Treg; CD3+ CD4+ CD25+ y factor de transcripción intracelular FoxP3+), y las NKT invariantes (iNKT; CD3+ y TCR V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+), son las principales poblaciones celulares encargadas de mantener la función de homeostasis inmunológica (7, 8, 9, 10). Las células iNKT son claves para desarrollar los mecanismos de tolerancia oral (11), ya que una depleción hepática de estas células implica en un modelo animal de ratón la incapacidad de desarrollar cualquier tipo de tolerancia oral (12). El mecanismo propuesto para ese efecto parece implicar que dicha población induciría el desarrollo de células dendríticas tolerogénicas, las cuales a su vez inducirán la proliferación de células T reguladoras (11, 13, 14, 15).

Por otra parte, se sabe que las células iNKT están implicadas en algunas patologías intestinales, como la colitis ulcerosa (16, 17), enfermedad de Crohn (17). Recientemente se ha incluso sugerido su papel en la EC (18), debido a que comparten características de células tanto innatas como adaptativas, además de una rápida capacidad de producir tanto IL-4 como IFN $\gamma$  en grandes cantidades (19, 20). Todas estas características, conjuntamente con la producción en poco tiempo y grandes cantidades de IFN $\gamma$  en ausencia de IL-12 parece indicar que quizás dicha población celular realmente juega un papel en el duodeno-EC.

En este capítulo, se decidió estudiar la densidad de células iNKT y Treg presentes en explantes duodenales de pacientes EC, tanto tratados como sin tratar, además de en un grupo de pacientes controles sanos. Debido al escaso número, en proporción, en que estas células se expresan en el duodeno conjuntamente con el escaso número de explantes duodenales obtenidos por paciente, un análisis de densidad celular determinado por citometría de flujo en los compartimentos intraepiteliales y de lámina propia puede no resultar lo suficientemente preciso (Schreurs, M.W. comunicación personal). En consecuencia, el análisis de ambas poblaciones se realizó a nivel molecular, mediante un análisis de expresión de mRNA. Interesantemente, los datos obtenidos mostraron que los pacientes EC, tanto tratados como sin tratar, presentaban un ratio incrementado de células iNKT/Treg por oposición a los pacientes controles no-EC. Adicionalmente, los niveles de expresión de las células iNKT mostraron una correlación en los pacientes EC tanto con el grado de lesión histológica como con la producción de IFN $\gamma$ , la cuál también se encontraba aumentada en los pacientes EC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se estudiaron un total de 38 pacientes con EC, de los cuáles 15 se encontraban en DSG y 23 se encontraban sin tratar. Como controles, se incluyó un grupo de 17 pacientes no-EC, ninguno de los cuales presentaba alteración histológica de la mucosa duodenal, y en lo que se había descartado el diagnóstico de EC. Todos los pacientes fueron recogidos en los Servicios de Gastroenterología y Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

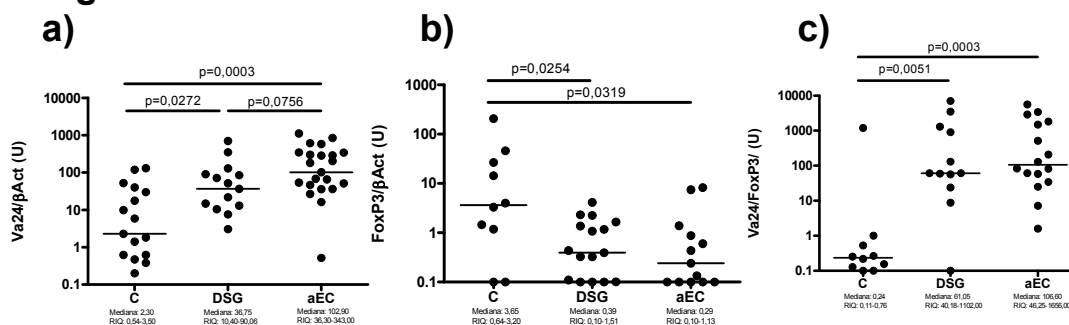
De cada paciente se obtuvo un explante duodenal, que fue recogido en solución de RNAlater e inmediatamente congelado. El RNA total fue extraído según el procedimiento de TRIZOL<sup>®</sup>, y el cDNA, obtenido mediante el kit SuperScript<sup>®</sup> First-Strand Synthesis System for reverse Transcriptase (RT)-PCR. Se determinaron los niveles de mRNA de V $\alpha$ 24 (representativo de las células iNKTs) y FoxP3 (representativo de las células T reguladoras), así como de IFN $\gamma$  y  $\beta$ -actina (usado como gen *house keeping*). Las secuencias de los primers, y sus condiciones de PCR están descritos en la tabla III.1. Todas las moléculas que no presentaron niveles detectables de expresión, se les asignó un valor arbitrario de 0,1. Finalmente, se realizaron análisis de correlación y análisis tanto no paramétricos (tests Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney) como robustos (ANOVA robusto y aproximaciones de Yuen, Mee y Lincon) (21) para la evaluación de los niveles de mRNA. El nivel de significación fue fijado en  $p < 0,05$ .

RESULTADOS

Mayor ratio Va24/Treg en el duodeno celiaco

No se encontró correlación ni entre la edad ni el género con la expresión de las moléculas Va24 y FoxP3 (datos no mostrados). Tras aplicar una estadística robusta se puede concluir que la expresión de la molécula Va24 se encuentra claramente incrementada en el duodeno de los pacientes EC frente a los controles no-EC (Figura VII.1a). Adicionalmente, y dentro de los pacientes EC, la expresión de dicha molécula se encontraba a su vez aumentada en los pacientes sin tratar, por oposición a aquellos pacientes tratados en DSG sin ninguna alteración duodenal. Por el contrario, la expresión de la molécula FoxP3 se encontraba mucho menos expresada en los pacientes EC, donde no se encontraban diferencias entre los pacientes en actividad y los tratados en DSG (Figura VII.1b). En consecuencia, los pacientes EC presentaban un nivel mucho mayor de expresión Va24 comparado frente a FoxP3 que en los pacientes controles no-EC (Figura VII.1c).

Figura VII.1

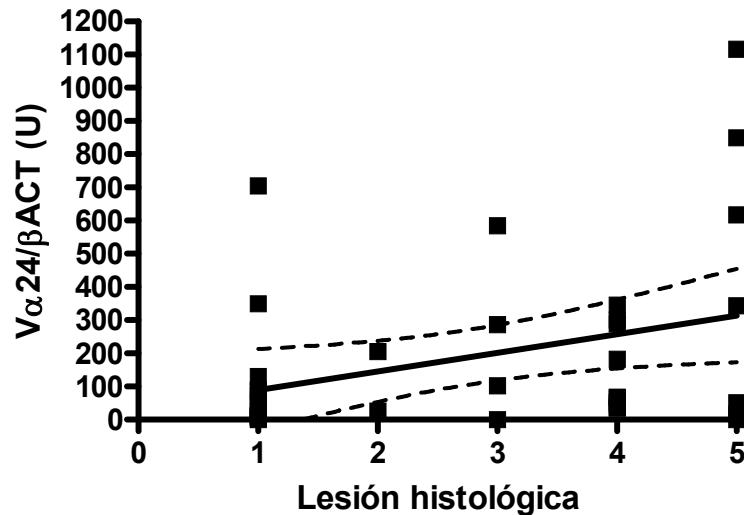


Expresión intestinal, en unidades arbitrarias (U), del mRNA de Va24 (a), FoxP3 (b), y el ratio individual resultante entre ambas moléculas en pacientes controles no-EC (C, n=17), y de pacientes EC, tanto tratados en dieta sin gluten (DSG, n=15) como en actividad (aEC, n=23) en explantes duodenales no cultivados y directamente preservados en RNA later. En los 3 casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis y Anova robusto, p<0,05). Se señalan los p-valores obtenidos mediante test U de Mann-Whitney, en todos aquellos casos en los que la aproximación robusta (tests de Yuen, Mee y Lincon) resultó estadísticamente significativa. Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartílico.

Correlación entre la expresión de Va24 y daño tisular.

Interesantemente, en los pacientes EC se encontró una correlación entre la lesión histológica (clasificación de Marsh) y la expresión de la molécula Va24, donde todos los pacientes EC en DSG presentaban una alteración mucosa tipo Marsh 0-I, mientras que en los pacientes en actividad la lesión variaba entre Marsh II y Marsh IIIc (FIGURA VII.1)

Figura VII.2

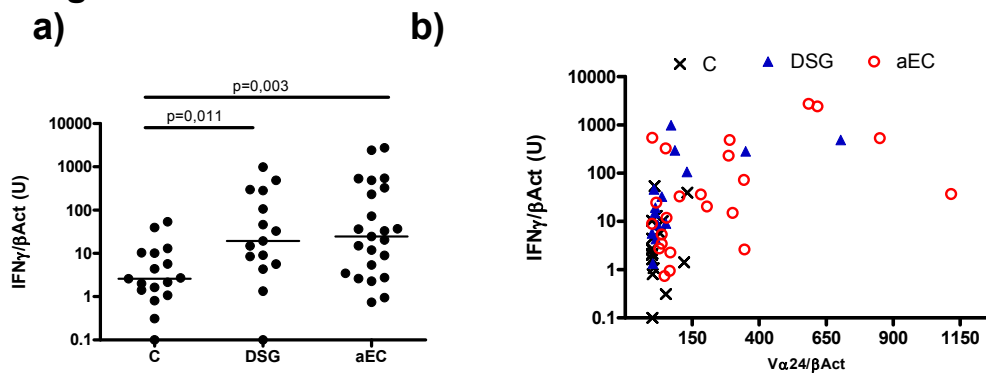


Correlación entre la expresión intestinal del mRNA de la molécula Vα24, en unidades arbitrarias (U), y la lesión histológica en los pacientes EC (1: Marsh 0-1; 2: Marsh II; 3: Marsh IIIa; 4: Marsh IIIb; 5: Marsh IIIc). La gráfica muestra un incremento de la expresión de Vα24 frente a la lesión histológica ( $r$  de Spearman  $r = 0,063$ ,  $p = 0,033$ ). Todos los pacientes EC tratados en DSG presentaban una lesión Marsh tipo 0-1 (lesión 1), mientras que todos los pacientes EC en actividad presentaban una lesión que variaba entre Marsh tipo II (lesión 2), IIIa (lesión 3), IIIb (lesión 4) y IIIc (lesión 5).

### Correlación entre la expresión de Vα24 e IFNγ.

Finalmente, y conforme a resultados previamente señalados en el capítulo V, la expresión de la molécula IFNγ se encontró aumentada en los pacientes EC (Figura VII.3a), tanto tratados como en actividad, comparados frente a los controles no-EC. Interesantemente, se encontró una correlación entre la expresión de dicha molécula y la expresión en los mismos explantes de la molécula Vα24 únicamente en los pacientes EC (Figura VII.3b), lo que realmente parece confirmar a la población iNKT duodenal como una pieza clave en la inmunopatogénesis celiaca.

Figura VII.3



Expresión intestinal, en unidades arbitrarias (U), del mRNA IFN $\gamma$  (a) en pacientes control no-EC (C, n=17), y de pacientes EC, tanto tratados en dieta sin gluten (DSG, n=15) como en actividad (aEC, n=23) en explantes duodenales no cultivados y directamente preservados en RNA later. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis y Anova robusto,  $p < 0,05$ ). Se señalan los p-valores obtenidos mediante test U de Mann-Whitney, en todos aquellos casos en los que la aproximación robusta (tests de Yuen, Mee y Lincon) resultó estadísticamente significativa. (b) Correlación, en los mismos pacientes, entre los niveles de IFN $\gamma$  y la expresión de V $\alpha$ 24, en unidades arbitrarias (C: r de Spearman = 0,089,  $p = n.s.$ ; DSG: r de Spearman = 0,5393,  $p = 0,038$ ; aEC: r de Spearman = 0,437,  $p = 0,037$ ).



## DISCUSION

Pese a que no todas las células que expresan la cadena V $\alpha$ 24+ del TCR son células iNKT, el análisis de dicha molécula es mucho más restrictivo que el de V $\beta$ 11, como se observa en la figura VI.1. Adicionalmente, dicho abordaje para el estudio de la población iNKT ha sido ampliamente utilizado, no sólo a nivel de mRNA como en este caso sino mediante inmunohistoquímica y citometría (17,18). De hecho, el estudio de la expresión de dicha población celular a nivel de mRNA se ha postulado recientemente como una alternativa mucho más fiable que la determinación de la co-expresión de CD3+ y CD161+ como se realiza tradicionalmente, ya que los propios linfocitos T no NKT pueden inducir la expresión de CD161+ tras activarse (22). De forma similar, el estudio de la expresión del mensajero FoxP3 es una medida indirecta para determinar la densidad de células Treg a nivel molecular en una muestra. En consecuencia, el estudio de expresión del RNA de ambas moléculas es un abordaje válido para obtener una medida de la densidad de células iNKT y Treg respectivamente.

Los datos obtenidos, señalan una mayor proporción de células iNKT en el intestino celiaco conjuntamente con una menor densidad de células Treg, lo que apunta a una mayor condición pro-inflamatoria en dichos pacientes con independencia del estado de la dieta. El déficit de células Treg podría facilitar la respuesta inmunológica a la gliadina en los pacientes EC. De esta forma, un mismo estímulo innato ejercido por la gliadina podría ser más fácilmente regulado por los individuos controles no-EC gracias a la mayor densidad de células Treg, autolimitándose la respuesta inflamatoria, y por tanto no desarrollando la enteropatía. Adicionalmente, la mayor densidad de la población iNKT parece que podría tener un papel mucho más activo en la EC, ya que sus niveles no sólo se encuentran más elevados tras el tratamiento y completa recuperación (histológica y serológica) comparados frente a los controles no-EC, sino que además se encuentran expandidas en la fase activa de la enfermedad. En este sentido, las células iNKT reconocen moléculas presentadas en el contexto de CD1d (10, 20), el cual es expresado por los enterocitos en la membrana baso-lateral (10, 20,) donde también se localizan los linfocitos intraepiteliales. Adicionalmente, los enterocitos son capaces de realizar presentación antigénica, habiéndose demostrado incluso que son capaces de activar *in vitro*, de forma CD1d-dependiente, a población iNKT (23, 24). De forma similar, recientemente se ha visto que tanto la población NKT, determinada

## CAPÍTULO VII

### *Mayor balance de iNKT/Treg en el duodeno celiaco*

---

como CD3+CD161+ (25, 26) (y de la que las células iNKT son mayoría (27)) como la población iNKT, determinada como CD3+CD161+ $\alpha$ 24+ (26), podrían superar el 20% del compartimento intraepitelial del intestino delgado. Todos juntos, estos datos sugieren que realmente puede existir una intercomunicación *in vivo* entre los enterocitos y las células iNKT del compartimento intraepitelial a través de CD1d, lo cuál podría activar a los linfocitos iNKT. En condiciones normales, y en ausencia de una señal de peligro, el principal efecto de la población iNKT sería el de regular la inmunidad adaptativa y prevenir fenómenos de autoinmunidad expandiendo la población de células Treg además de deplecionar los clones específicos de células T CD4+ específica de antígeno (28). Sin embargo, cuando la presentación antigénica ocurre conjuntamente con una señal de estrés, dichas células rápidamente desencadenan una cascada pro-inflamatoria. Por tanto, y dado que la gliadina estaría induciendo rápidamente IL-15 y en grandes cantidades incluso tras sólo 3 horas (Figura IV.4b) el perfil de respuesta de las células iNKT se decantaría hacia la producción de IFN $\gamma$  sin mediar IL-12, además de contribuir también a la apoptosis enterocitaria. En este sentido, una vez que las células iNKT son activadas de forma CD1d dependiente, producirán grandes cantidades de IFN $\gamma$  y en muy cortos periodos de tiempo (1-2 horas) (29), situación que precisamente caracteriza a la lesión celiaca. La presencia de mRNA de IFN $\gamma$  preformado en dicha población celular incluso en reposo podría explicar el origen de la rápida y abundante respuesta de IFN $\gamma$  (29) en ausencia de IL-12. Interesantemente, los datos obtenidos en este capítulo parecen confirmar dicha posibilidad, ya que se ha encontrado una correlación entre los mayores niveles de IFN $\gamma$  y de células  $\alpha$ 24+ en el duodeno celiaco, conjuntamente con el grado de lesión histológica en los pacientes EC, lo que claramente sugiere que dicha población celular está implicada en la inmunopatogénesis de la enteropatía celiaca. Queda sin embargo por comprender exactamente el papel que desencadenarían las células  $\alpha$ 24+ en el duodeno celiaco ya que sus ligandos endógenos específicos son aún desconocidos. Una posibilidad, podría ser que sus ligandos naturales fueran glicolípidos intracelulares que únicamente estarían expuestos al exterior en caso de un estrés que desencadenase una apoptosis/necrosis (28, 30), desviándose así su función homeostática a una pro-inflamatoria. De esta forma, la IL-15 inducida por la gliadina en el duodeno estaría contribuyendo a activar a la células iNKT, tanto directamente al ser dicha citocina imprescindible para el desarrollo, maduración y activación de dichas células (31),

como indirectamente al inducirse apoptosis y por tanto facilitarse el reconocimiento de sus ligandos naturales.

En conclusión, en este capítulo se ha confirmado una mayor densidad de células de actividad pro-inflamatoria, determinado como ratio  $V\alpha 24/FoxP3$ , en los pacientes EC, con independencia de la DSG, conjuntamente con una correlación entre los niveles de expresión de  $V\alpha 24$  y la lesión tisular así como expresión de IFN $\gamma$ . El hecho de que la expresión de  $V\alpha 24$  permanezca incrementado en los pacientes EC sin lesión histológica y serología negativa conjuntamente con la menor expresión de células FoxP3+ podría dar una configuración más susceptible a la inflamación al duodeno celiaco. De esta forma, un mismo estímulo de gliadina, que induciría IL-15 en todos los individuos, podría ser más efectivo en los pacientes EC para desencadenar la inmunidad adaptativa secundaria no solamente consecuencia de la mayor densidad de sus receptores, sino también por la mayor predisposición celular a una respuesta rápida mediada por IFN $\gamma$ . En este sentido, esta línea de investigación debería continuarse mediante la realización de estudios funcionales. Estudios de estimulación con solución de gliadina deberían realizarse en pacientes EC en DSG para tratar de determinar la respuesta en la expresión de  $V\alpha 24$  conjuntamente con la inducción de IFN $\gamma$ . Adicionalmente la confirmación a nivel celular, mediante citometría de flujo en el compartimento intraepiteial, de los resultados aquí obtenidos se antoja clave para definitivamente demostrar el papel de las células iNKT en la EC.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1 Maki M, Collin P. (1997) Celiac disease. *Lancet*. Jun 14;349(9067):1755-9
- 2 Sollid LM. (2002) Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):647-55.
- 3 Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Sep;3(9):516-25.
- 4 Bernardo D, Garrote JA, Fernández-Salazar L, et al. (2007) Is gliadin really safe for non-celiac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-celiac individuals challenged with gliadin peptides. *Gut*. Jun;56(6):889-90
- 5 Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. (1994) 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*. Apr;35(4):476-82.
- 6 Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H, Roy G. (2000) Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr*. Mar;89(3):285-90.
- 7 Battaglia A, Di Schino C, Fattorossi A, Scambia G, Evoli A. (2005) Circulating CD4+CD25+ T regulatory and natural killer T cells in patients with myasthenia gravis: a flow cytometry study. *J Biol Regul Homeost Agents*. Jan-Jun;19(1-2):54-62
- 8 Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Eloi-Santos SM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes *Scand J Immunol*. Sep;62(3):297-308
- 9 La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi. (2006) CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators *Trends Immunol*. Jul;27(7):322-7
- 10 van Dieren JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Escher JC, Samsom JN, Blumberg RS, Nieuwenhuis EE. (2007) Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis*. May 2; [Epub ahead of print]
- 11 Roelofs-Haarhuis K, Wu X, Gleichmann E. Oral tolerance to nickel requires CD4+ invariant NKT cells for the infectious spread of tolerance and the induction of specific regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):1043-50.
- 12 Trop S, Samsonov D, Gotsman I, Alper R, Diment J, Ilan Y. Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):746-55.
- 13 Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolle PA, Thomas RK, von Bergwelt-Baildon M, Debey S, Hallek M, Schultze JL. (2005) Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. Sep 15;106(6):2018-25
- 14 Thornton AM, Shevach EM. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.
- 15 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. (2001) Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*. Aug;182:58-67.
- 16 van Dieren JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Escher JC, Samsom JN, Blumberg RS, Nieuwenhuis EE. Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Sep;13(9):1146-52.

- 17 Grose RH, Thompson FM, Baxter AG, Pellicci DG, Cummins AG. Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2007 Jun;52(6):1415-22.
- 18 Grose RH, Cummins AG, Thompson FM. Deficiency of invariant natural killer T cells in coeliac disease. *Gut*. 2007 Jun;56(6):790-5.
- 19 van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM. Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol*. 2001 Aug;100(2):144-8.
- 20 van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Nishi N, Kölgen W, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol*. 2004 Jul;112(1):8-23.
- 21 García Perez A. On robustness for hypotheses testing. *International Statistical Review*. 1993 61:369-85.
- 22 Wingender G, Kronenberg M. Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Jan;294(1):G1-8.
- 23 van de Wal Y, Corazza N, Allez M, Mayer LF, Iijima H, Ryan M, Cornwall S, Kaiserlian D, Hershberg R, Koezuka Y, Colgan SP, Blumberg RS. Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1420-31.
- 24 Panja A, Blumberg RS, Balk SP, Mayer L. CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med*. 1993 Sep 1;178(3):1115-9.
- 25 Imai T, Watanabe H, Suda T, Okamoto H, Abo T, Hatakeyama K. CD161+ T (NT) cells exist predominantly in human intestinal epithelium as well as in liver. *Clin Exp Immunol*. 2002 Jul;129(1):92-8.
- 26 O'Keefe J, Doherty DG, Kenna T, Sheahan K, O'Donoghue DP, Hyland JM, O'Farrelly C. Diverse populations of T cells with NK cell receptors accumulate in the human intestine in health and in colorectal cancer. *Eur J Immunol*. 2004 Aug;34(8):2110-9.
- 27 Cardell SL. The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*. 2006 Feb;143(2):194-202.
- 28 Kim HJ, Hwang SJ, Kim BK, Jung KC, Chung DH. NKT cells play critical roles in the induction of oral tolerance by inducing regulatory T cells producing IL-10 and transforming growth factor beta, and by clonally deleting antigen-specific T cells. *Immunology*. 2006 May;118(1):101-11.
- 29 Yu KO, Porcelli SA. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett*. 2005 Aug 15;100(1):42-55.
- 30 Ajuebor MN. Role of NKT cells in the digestive system. I. Invariant NKT cells and liver diseases: is there strength in numbers? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Oct;293(4):G651-6.
- 31 Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol*. 2005 Apr;79(7):4470-8.



# *CAPÍTULO VIII*

## *DIGESTIÓN DIFERENCIAL DE LA GLIADINA POR LA MUCOSA INTESTINAL DE LOS PACIENTES CELIACOS.*

*Manuscrito enviado para publicación*





**INTRODUCCIÓN**

La enfermedad celíaca (EC), es una hipersensibilidad del intestino delgado frente al trigo y otros cereales que contienen gluten (cebada, centeno y probablemente avena) en individuos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8) (1,2). Su único tratamiento reside en la dieta estricta sin gluten (DSG) de por vida, tras la cual remite toda la sintomatología.

Tradicionalmente, se consideraba que la EC era consecuencia de una deficiencia enzimática o de cualquier otro mecanismo que actuase a lo largo de la digestión y que en última instancia implicaba una digestión no completa de la gliadina en los pacientes celíacos (“hipótesis de la peptidasa perdida” o “hipótesis metabólica” (3). Esta hipótesis estaba incluso avalada por varios estudios que confirmaban el déficit de digestión de la gliadina por parte de explantes protéicos de biopsias duodenales de pacientes EC frente a los de individuos controles sanos no-EC (4-9). Sin embargo, la hipótesis metabólica ha sido actualmente descartada como una posible explicación a la EC, probablemente porque nunca se obtuvo información alguna acerca del origen de las enzimas que estarían implicadas en este déficit de degradación de la gliadina. Pese a todo, dicha hipótesis de una diferente digestión de gliadina por parte de individuos EC y no-EC, permitiría explicar por qué pese a que la gliadina realmente parece ser un potente disparador inespecífico de la inmunidad innata (10), únicamente dispararía dicha respuesta en individuos con un determinado acervo en común, que también incluiría el HLA-DQ2/DQ8, mayor densidad de IL15R $\alpha$ , mayor permeabilidad de las *tight-junctions*...

La zimografía es una técnica basada en una separación electroforética que permite la identificación de diferentes actividades proteasas en una misma muestra. Las proteasas específicas de sustrato son separadas en un gel de poliacrilamida copolimerizado con el sustrato diana de acuerdo a su peso molecular. Además, su actividad es revelada en el mismo ensayo, lo que abre nuevas posibilidades a la identificación de las “peptidasas perdidas”. Esta técnica es capaz de medir correctamente diferencias en el total de la actividad proteasa, con absoluta independencia de la expresión de los mRNA y/o de la carga de las pre-pro-proteasas (no activas). Este hecho es especialmente importante al estudiar la actividad proteasa ya que la actividad transcripcional no refleja necesariamente la actividad de un gen, lo que es especialmente cierto en el caso de las proteasas que además requieren un corte proteolítico para activarse (11).

Basándonos en estudios previos, tanto los que dieron lugar a la “hipótesis de la peptidasa perdida” o “hipótesis metabólica”, como los más recientes que han servido de apoyo para proponer la administración de prolil-endopeptidasas como medida terapéutica suplementaria, nos planteamos estudiar de forma específica la actividad hidrolítica de la gliadina en el intestino de los pacientes con EC, e identificar la posible existencia de alteraciones individuales en el patrón de los enzimas capaces de realizar esta función. Este defecto/s podría explicar la persistencia en la mucosa de intestino delgado de grandes péptidos inmunogénicos capaces de activar respuestas de la inmunidad innata y/o adquirida frente al gluten, responsables de la lesión intestinal en estos pacientes.

Con esta finalidad, se realizaron estudios mediante la técnica de zimografía sobre sustrato de gliadina utilizando extractos proteicos obtenidos a partir de explantes de biopsia duodenal de pacientes con EC, tanto en fase activa como en tratamiento con DSG, además de extractos obtenidos de pacientes control no-EC. Nuestro interés se ha centrado primero en identificar o confirmar la existencia de un posible defecto en la digestión de la gliadina en la mucosa duodenal de los pacientes con EC, y después en caracterizar la naturaleza y propiedades funcionales de las proteasas con actividad hidrolítica sobre la gliadina, además de estudiar el origen de estas proteasas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Sujetos de estudio**

Se obtuvieron un total de 29 explantes duodenales de pacientes EC (20 no tratados al momento del diagnóstico y 9 tratados con DSG) y de 18 individuos control sanos no-EC sin ninguna alteración duodenal al momento de la biopsia. Todos los pacientes fueron recolectados en los servicios de Gastroenterología Adulta y Pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

### **Preparación de muestras**

Los explantes duodenales fueron sumergidos inmediatamente en 0,5ml de solución de RNALater® (Ambion) y mantenidos a -20°C hasta su procesamiento. Las proteínas totales de cada explante fueron obtenidas tras la homogenización tisular (Heildolph Diast 900, Alemania) del explante completo. En ningún caso del proceso se añadieron inhibidores de proteasas con el objetivo de mantener inalterado el ensayo zimograma posterior.

### **Cultivo de biopsia**

Explantes duodenales provenientes de 3 pacientes EC fueron también cultivados *in vitro* como se describió previamente. En estos casos, el cultivo se realizó en condiciones basales por un tiempo total de 24 horas con las concentraciones previamente descritas de gentamicina, penicilina y estreptomina. Tras el cultivo, las muestras fueron embebidas en RNALater y procesadas como se describió en el epígrafe anterior.

### **Aislamiento leucocitario**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC o *peripheral blood mononuclear cells*) fueron purificadas desde pacientes EC tratados y no tratados con el protocolo del Ficoll. Adicionalmente se obtuvieron las sub-poblaciones de las biopsias intestinales, tanto linfocitos intraepiteliales (LIEs) como los linfocitos de lámina propia (LLP), desde explantes de pacientes EC en actividad. Tanto la fracción leucocitaria proveniente de sangre periférica como las sub-poblaciones aisladas de los explantes duodenales fueron procesadas para la obtención de las proteínas totales.

### **Análisis de zimografía**

Se realizaron análisis de zimografía en geles suplementados con gliadina y con gelatina, como se describió previamente en el capítulo III. Todos los ensayos se realizaron añadiendo 8µg totales de los extractos protéicos. En algunos casos, se realizaron inhibiciones específicas de proteasa en paralelo añadiendo inhibidores específicos de hasta 100K<sub>i</sub> al buffer de incubación, de las enzimas dipeptidyl-peptidase II (EC 3.4.14.2), Prolyl Oligopeptidase (EC 3.4.21.26), y matrix metallopeptidase-9 (EC 3.4.24.35) (todos de Calbiochem). Adicionalmente, algunos geles fueron incubados con concentraciones 20mM de EDTA. En todos estos casos, la misma muestra se cargó 2 veces en el mismo gel, relativizándose los resultados obtenidos en la mitad del gel incubada con el inhibidor frente al perfil de digestión obtenido en el buffer de incubación basal.

### **Fingerprinting y espectrometría de masas de trampa iónica**

Las enzimas hidrolíticas de gliadina fueron recuperadas en algunos casos del gel tras la electroforesis para tratar de caracterizarlas. Se les aplicó un análisis *fingerprinting* usando conjuntamente un MALDI-TOF Reflex™ IV Bruker (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Germany) y una espectrometría de masas de trampa iónica en un espectrómetro 3000<sup>plus</sup> (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) acoplada a un sistema cromatográfico Famos-Switchos-Ultimate (LCPackings, The Netherlands).

### **Microbiota asociada a las biopsias duodenales**

Explantes duodenales de 5 pacientes con EC fueron pre-incubados en medio de cultivo Brain Herat Broth (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) e YCFA (12) a 37°C durante 48h en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen; Oxoid, Basingstoke, UK) tratando de simular las condiciones duodenales para permitir el crecimiento de la microbiota asociada. Las células presentes en 1 ml del medio de cultivo (DO<sub>554</sub> de 4.0) fueron recogidas por centrifugación (15 min, 4°C, 12.000 rpm), lavadas y resuspendidas en 250µl de PBS. Un volumen de 4ml del sobrenadante de cultivo fue concentrado por ultrafiltración a través de un filtro de 10kDa (Amicon Ultra-4, Millipore, Bedford, MA, USA) hasta obtener un volumen de 250 µl, constituyendo la fracción extracelular. Las bacterias fueron homogeneizadas añadiendo un volumen de minibolas de cristal (0.1 mm diámetro; Sigma, St. Louis, MO) en un mini-Bead

Beater (Biospec Products, Washington, USA), tras aplicar 2 agitaciones de 90''. Las células intactas, junto a los restos bacterianos, fueron recolectadas por centrifugación (t=15', T=4°C, 12.000rpm) y resuspendidas en 250 µl de PBS, constituyendo la fracción particulada. Finalmente, el sobrenadante obtenido constituyó el extracto libre de células.

### **Análisis Estadístico**

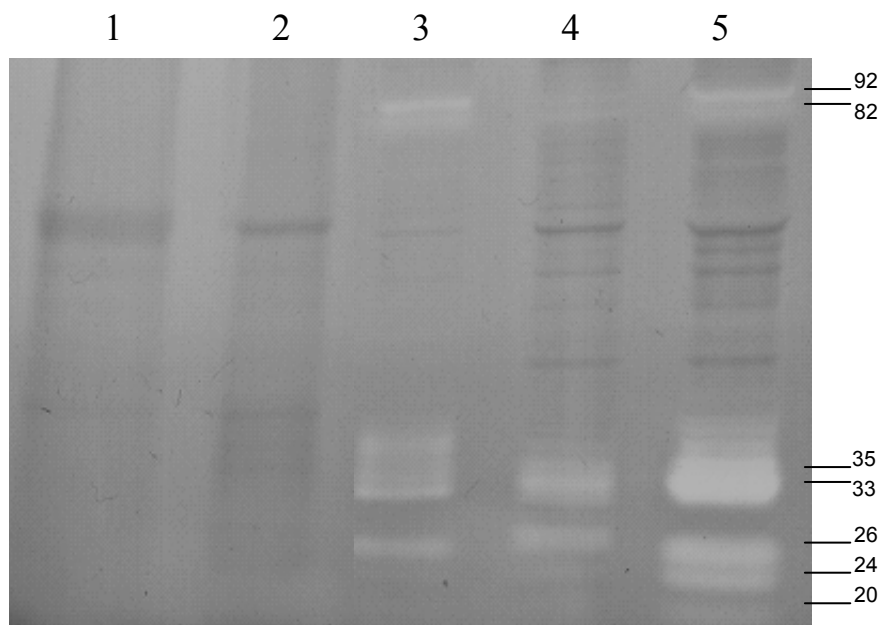
Se aplicó un chi-cuadrado de Pearson. P<0,05 fue considerado significativo.

## RESULTADOS

### Proteasas que *degradan* gliadina específicas del duodeno celíaco

Se encontró un patrón específico de proteasas con capacidad de degradar gliadina en las muestras duodenales de los pacientes con EC, que prácticamente no se detectaba en los individuos control no-EC (Figura VIII.1)

Figura VIII.1



Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes utilizando el extracto proteico duodenal de individuos control sanos no-EC (líneas 1-2), y pacientes con EC, tanto en actividad (líneas 3-4) como tratados en dieta sin gluten y sin alteraciones duodenales (línea 5).

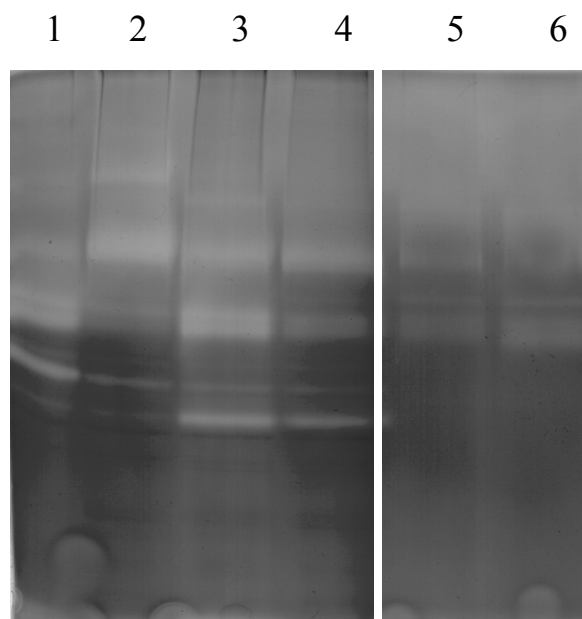
A la derecha, pesos moleculares aproximados, en kDa, de las proteasas identificadas.

El patrón de proteasas que degradan gliadina en los pacientes con EC fue reproducible, y estaba caracterizado por 7 proteasas específicas con pesos moleculares aproximados de 92, 82, 35, 33, 26, 24 y 20 kDa. Estas proteasas se encontraron en prácticamente todas las muestras de pacientes con EC, con independencia del estado de la mucosa y del tratamiento (17 de 20 de pacientes no tratados, y 8 de 9 pacientes tratados con DSG). No se encontraron diferencias en la intensidad de las bandas entre los pacientes tratados y no tratados. Es interesante señalar que dichas proteasas permanecieron prácticamente ausentes en los explantes de los individuos control no-EC (1 de 18,  $\chi^2$   $p < 0,0001$ ), comparado frente a los pacientes con EC tanto tratados como no tratados. Finalmente, no se

encontraron diferencias derivadas ni del género ni de la edad (niños o adultos) en dicho patrón.

En todos los casos se cargaron únicamente 8µg a cada pocillo, lo que descarta que las diferencias encontradas entre las muestras EC y no-EC fuesen derivadas de haber cargado una cantidad diferente de proteína. De igual manera, y dado que todas las muestras fueron procesadas por la misma persona y siguiendo el mismo protocolo, no parece posible que las muestras controles no-EC sufrieran un proceso diferente que pudiese haber alterado o inactivado las proteasas totales. Finalmente, la existencia de actividad gelatinasa en ambos tipos de muestras (Figura VIII.2) demostró que la ausencia de proteasas que degradan gliadina en los controles no-EC no era debido a una degradación de las proteasas.

**Figura VIII.2**

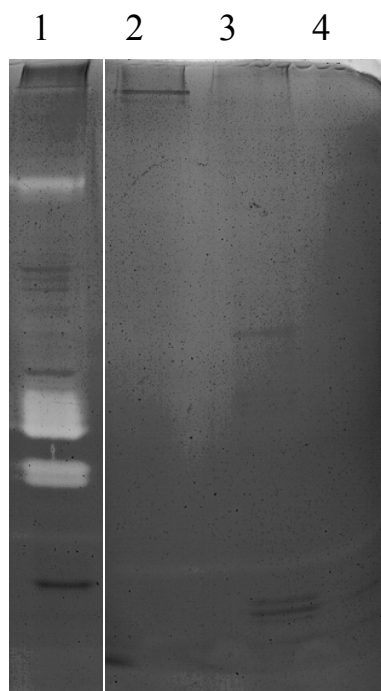


Zimograma de gelatina representativo de varios experimentos independientes utilizando el extracto proteico duodenal de pacientes con EC, tanto no tratados (líneas 1-2) como tratados en dieta sin gluten (líneas 3-4) e individuos control sanos no-EC (líneas 5-6).

Es digno de mención señalar también el hecho de que las muestras control no-EC presentaron un menor nivel de actividad gelatinasa cuando se comparan con las muestras EC. Estas diferencias podrían ser debidas al patrón diferente de metaloproteasas presentado por las muestras EC en la matriz extracelular (13), o podría reflejar incluso que alguna de las actividades de degradación de gliadina tuviera también el efecto de degradar la gelatina.

Finalmente, los zimogramas de gliadina se realizaron también utilizando extractos de los enterocitos-IELs y LPLs, así como de los PBMCs obtenidos de los pacientes con EC. Los resultados obtenidos descartaron una naturaleza leucocitaria de estas proteasas que degradan gliadina, ya que no se encontró dicha actividad en ningún otro caso (Figura VIII.3).

**Figura VIII.3**



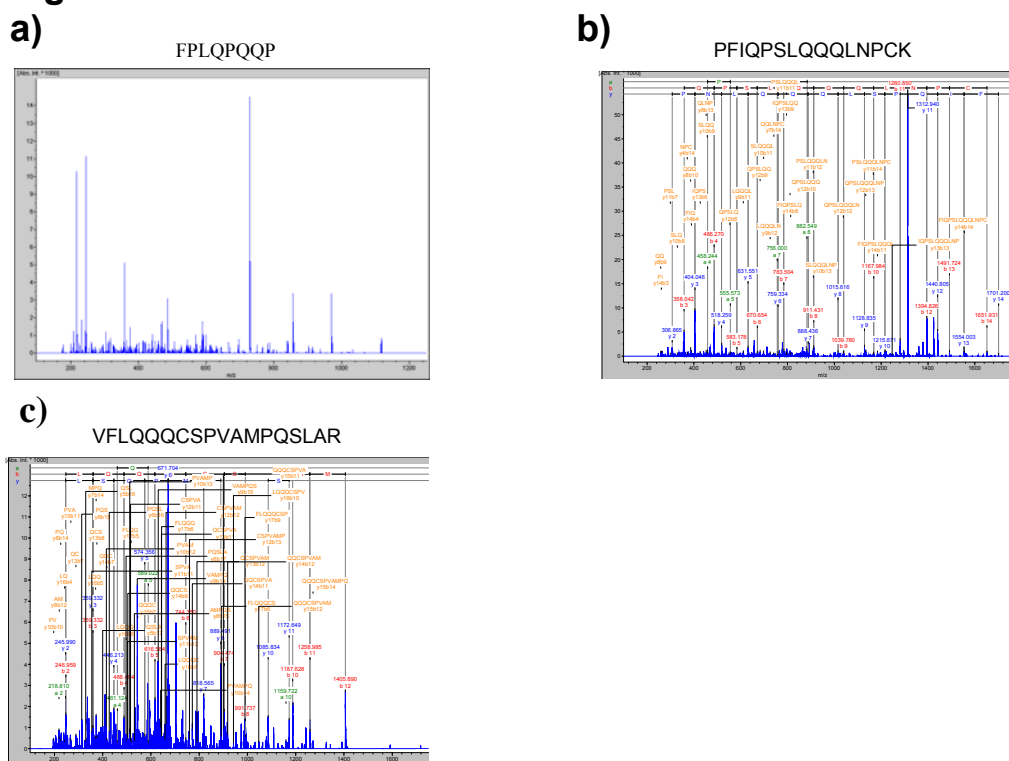
Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes. Cada línea representa el patrón de proteasas que degradan gliadina obtenido con el extracto proteico duodenal de un paciente con EC (línea 1), tras la obtención de IELs-enterocitos y LPLs (líneas 2 y 3, respectivamente) del mismo paciente, y con los PBMCs de otro paciente independiente (línea 4).

### **Las proteasas que degradan gliadina tienen actividad post-Prolina**

La proteasa que degrada gliadina de 26kDa fue recuperada de un zimograma con el objetivo de determinar su naturaleza por *fingerprinting*. Sin embargo, debido a la compleja naturaleza de la muestra (solución proteica de un explante completo de biopsia duodenal separada únicamente por una electroforesis monodimensional suplementada con un 0,1% de gliadina en la matriz), la técnica de *fingerprinting* no permitió observar ninguna coincidencia con otras proteínas conocidas. Por tanto, la muestra fue sometida a un nuevo análisis de espectrometría de masas de trampa iónica, que permitió secuenciar 3 péptidos diferentes procedentes de la banda original (Figura VIII.4).



Figura VIII.4



Péptidos identificados mediante espectrometría de masas de trampa iónica, utilizando una proteasa que degrada gliadina de 26 kDa recuperada de un zimograma de gliadina.

Es interesante señalar que ninguno de los 3 péptidos identificados resultó ser de naturaleza humana, sino que provenían de la gamma gliadina y glutenina de bajo peso molecular, debido al enmascaramiento que sufrió la enzima 26kDa por parte de la gliadina del zimograma desde el cuál fue recuperada (Tabla VIII.1). Sin embargo, 3 de los 6 puntos de corte identificados (los 2 del péptido 8mer y el N-terminal del 15-mer) no pudieron ser generados como consecuencia de la digestión tripsínica en la espectrometría de masas de trampa iónica, por lo que estos puntos de corte tendrían naturaleza biológica. Según la base de datos de peptidasas Merops (v 8.0) (14), ambos extremos del péptido 8-mer pudieron haber sido generados por varias proteasas humanas. Por el contrario, el punto N-terminal del péptido 15-mer (es decir, Pro-Pro), puede ser generado únicamente por 3 proteasas humanas: matrix metallopeptidase-9 (MMP9, M10.004, 92,0 kDa), prolyl oligopeptidase (POP, S09.001, 80,7 kDa), o dipeptidyl-peptidase II (DPP7, S28.002, 54.3kDa); o bien por una derivada de *Streptomyces* [proline-specific peptidyl-dipeptidase (M9D.002)].

**Tabla VIII.1**

8-mer	FPLQPQQP
gamma gliadina	<b>-SFPLQPQQPF-</b>
15-mer	PFIQPSLQQQLNPCK
gamma gliadina	<b>-PPFIQPSLQQQLNPCKN-</b>
18-mer	VFLQQQCSPVAMPQSLAR
LM glutenina	<b>-KVFLQQQCSPVAMPQSLARS-</b>

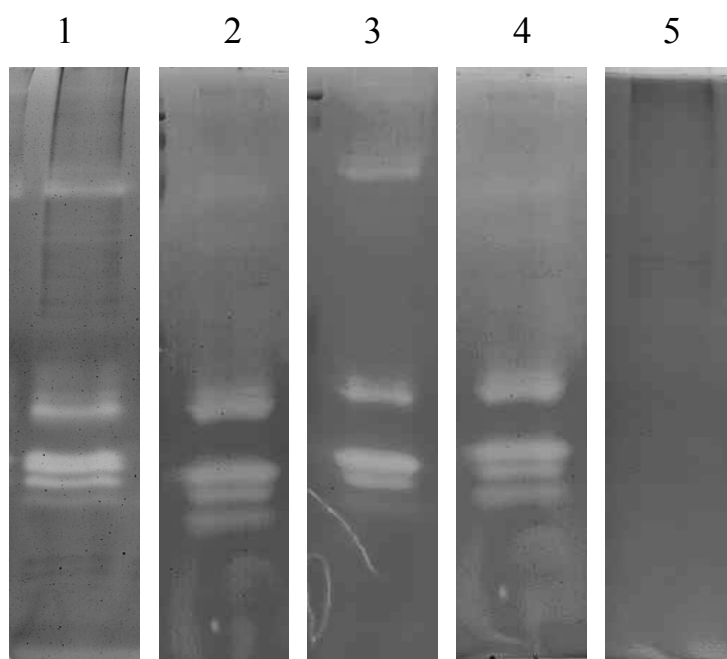
Péptidos identificados tras espectrometría de masas de trampa iónica en la proteasa de 26kDa, y alineamiento con la secuencia original de la proteína de la cuál proceden. En negrita, puntos de corte que no pudieron ser generados por la digestión tripsínica del proceso y que, por tanto, son derivados de actividad biológica.

### **Naturaleza metaloproteasa de las enzimas identificadas**

Ninguna de las 3 proteasas humanas posibles tenía pesos moleculares en el rango de la proteasa de 26 kDa, desde la cual se identificó el punto de corte Pro-Pro. Sin embargo, y dado que las pre-pro-formas de las proteasas se activan durante el experimento del zimograma (lo que se manifiesta en dicha técnica como al menos 2 pesos moleculares diferentes para la misma enzima (11)) se realizaron experimentos de inhibición para cada proteasa putativa. La figura VIII.5 muestra que pese a que las enzimas MMP9, POP y DPP7 son enzimas con actividad proteolítica Pro-Pro, ninguna de ellas parece ser responsable de las actividades degradadoras de gliadina, ya que no se obtuvo inhibición en sus actividades tras añadir concentraciones inhibitorias específicas de hasta 100Ki al buffer de incubación.

Por el contrario, en la misma figura se observa como todas las proteasas degradadoras de gliadina son de naturaleza metaloproteasa, ya que todas se inhibieron al suplementar el buffer de incubación con EDTA 20mM.

Figura VIII.5



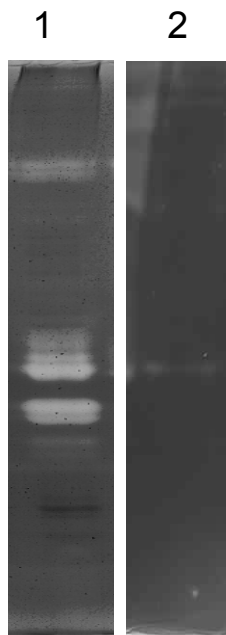
Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes. Cada línea representa el patrón de proteasas que degradan gliadina obtenido del extracto proteico duodenal de un paciente con EC tras incubación en buffer de incubación (línea 1), y tras suplementación con inhibidores específicos para POP (+100ki, línea 2), DPP7 (+100ki, línea 3), MMP9 (+100ki, línea 4), o con +20mM EDTA (línea 5)

Es interesante también que el otro enzima descrito con actividad proteolítica Pro-Pro resultó ser una metaloproteasa de origen bacteriano. Esto nos llevó a proponer que quizás las proteasas identificadas, o al menos la de 26kDa, pudieran ser derivadas de bacterias presentes en el duodeno de los pacientes con EC.

### Las proteasas que degradan gliadina son de origen bacteriano

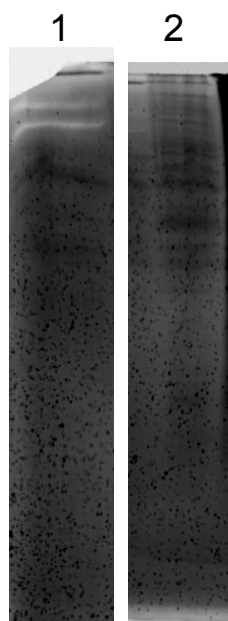
Para evaluar la posibilidad de que la actividad *degradante* de gliadina detectada fuera derivada de la microbiota duodenal, se evaluó la actividad de estas enzimas tras incubar los explantes duodenales de pacientes con EC, tanto tratados como sin tratar, durante 24 horas en presencia de antibióticos (penicilina, estreptomycin y gentamicina). Dicho proceso causó la eliminación de toda la actividad *degradadora* de gliadina, al comparar frente a los explantes basales no tratados del mismo paciente, lo que confirmaba la naturaleza microbiana de dichas actividades enzimáticas (Figura VIII.6).

**Figura VIII.6**



Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes. Cada línea representa el patrón de proteasas que degradan gliadina obtenido del extracto proteico duodenal de un paciente con EC que fue congelado directamente (línea 1) y tras cultivar en presencia de antibióticos otro explante del mismo paciente (línea 2)

A continuación se evaluó la presencia de dichas proteasas que degradan gliadina en la microbiota duodenal asociada de 5 pacientes con EC en actividad, tras su expansión en 2 medios de cultivo bacteriológicos. Se encontró actividad *degradadora* de gliadina en todos los extractos bacterianos, así como en la mayoría de las fracciones extracelulares (4 de 5) (Figura VIII.7). Los zimogramas de la microbiota recuperada en medio BH mostró un patrón de bandas de 200, 187, 116, 97, 92, 82, 51, 45, 24 y 20 kDa, mientras que aquellas crecidas en medio YCFA mostraron bandas hidrolíticas de 187, 82, 45 y 24 kDa. Es digno de mención que las bandas microbianas de 92, 82, 24 y 20 kDa se corresponden con aquellas detectadas directamente en los explantes duodenales de los pacientes con EC. Además, las actividades de origen bacteriano 116, 82, 51, y 20 kDa también fueron inhibidas tras la incubación con EDTA (Figura VIII.7) lo que confirma su naturaleza metaloproteasa.

**Figura VIII.7**

Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes. Cada línea representa el patrón de proteasas que degradan gliadina obtenido desde la microbiota asociada a los explantes duodenales de un paciente EC en actividad con actividades degradadores de gliadina de 92 y 82 kDa (línea 1), y tras incubación con 20mM de EDTA (línea 2).

## **DISCUSION**

En este capítulo se ha descrito por primera vez la existencia de un patrón específico de metaloproteasas bacterianas con capacidad de degradar gliadina en la mucosa duodenal de los pacientes con EC. Este patrón, además, ha resultado ser independiente de la situación de los pacientes y del seguimiento de la DSG. Esto descarta un efecto secundario derivado de la condición inflamatoria del intestino celíaco y consecuencia de la actividad de las metaloproteasas de la matriz (*Matrix Metalloproteases* o MMPs), que nunca se encuentran en los pacientes en DSG sin alteraciones duodenales, y apunta a la existencia de diferencias primarias en el intestino.

Tras identificar este patrón específico de proteasas capaces de degradar gliadina en la mucosa duodenal (a las que proponemos llamar gliadinasas), nos preguntamos a continuación si podrían ser derivadas del infiltrado leucocitario que presentan los pacientes con EC, que se mantiene elevado incluso tras el seguimiento de la DSG, en comparación con los individuos control no-EC (15, 16, 17). Los resultados obtenidos apuntan a un origen no leucocitario de las gliadinasas, ya que éstas no se revelaron ni en los PBMCs ni en los compartimentos intraepitelial o de la lámina propia aislados a partir de pacientes con EC (Figura VIII.3). De igual manera, pese a que se ha descrito ampliamente el papel de las MMPs en la remodelación tisular de la mucosa intestinal en la EC, los resultados obtenidos descartan su implicación como fuente de las gliadinasas al haberse encontrado en el duodeno de pacientes tratados con DSG sin alteración duodenal y que no expresan dichas MMPs (13, 18) (Figura VIII.1).

La inhibición de todas las gliadinasas después de 24 horas de cultivo de los explantes en medio suplementado con grandes cantidades de antibióticos, nos llevó a sopesar un origen bacteriano para dichas actividades proteasa. Esta hipótesis fue finalmente demostrada tras revelarse algunas de estas actividades en la microbiota asociada al duodeno celíaco. Somos conscientes, sin embargo, que no se encontraron todas las gliadinasas en los cultivos bacterianos, y que tampoco todas las gliadinasas encontradas en los cultivos estaban presentes en los explantes, pese a que se encontró correlación entre los pesos moleculares de 4 gliadinasas diferentes. La falta de una correlación completa entre ambos patrones de gliadinasas podría ser debida al sesgo introducido en los cultivos bacterianos. La incubación de los explantes duodenales en un medio de cultivo específico podría conducir a un

enriquecimiento de ciertas cepas frente a otras, de forma que la población microbiana final podría no representar completamente la flora presente en condiciones basales en los explantes. De hecho, la bacteria más común en el duodeno podría no estar representada en el cultivo bacteriano final, o incluso una cepa no demasiado común en el duodeno podría acabar siendo la más frecuente en el crecimiento final. En este sentido, el uso de diferentes medios de cultivo para enriquecer la flora microbiana asociada a los explantes condujo a la detección de diferentes patrones de actividad gliadinasa. Es interesante señalar que al menos 2 de las gliadinasas fueron inhibidas en EDTA, lo que confirma su naturaleza metaloproteasa. En este contexto, se ha descrito recientemente que algunas metaloproteasas de *Bacteroides fragillis* estarían implicadas en un modelo murino de colitis (19).

Estas bacterias con capacidad de metabolizar el gluten podrían ser uno de los factores ambientales desconocidos que participan en el desarrollo de la EC. De esta manera, diferencias en la colonización duodenal por parte de la microbiota podrían explicar por qué el 30% de los gemelos monozigotos no correlacionan con el desarrollo de la EC (2) pese a tener el mismo acervo genético, además de otros factores ambientales importantes, como son el periodo de lactancia materna o la edad en la que se produce la primera ingesta de gluten. En este sentido, las bacterias que metabolizan gluten podrían estar ausentes, o en un número mucho más reducido, en el gemelo no-EC, o incluso en el duodeno de todos los individuos no predispuestos, en comparación con aquellos que desarrollan la EC.

Recientemente, se ha descrito la existencia de diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición de la flora fecal entre niños con EC e individuos control (20, 21), así como en los metabolitos derivados de la actividad microbiana del intestino entre pacientes con EC, familiares de primer grado, e individuos control no-EC (22). Es interesante señalar que la presencia de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado de los pacientes con EC había sido descrita en estudios previos (23). Es más, pese a que el duodeno es una región tradicionalmente considerada estéril, o con un pequeño número de bacterias, se ha observado también -por microscopía electrónica de barrido- la existencia de una flora bacteriana baciliforme específica de los pacientes con EC (24), que estaba ausente en los individuos control no-EC. Estos autores concluyeron que la capa mucosa y de glicocálix de los individuos susceptibles de EC, podrían promover la penetración bacteriana y la

subsiguiente unión al epitelio (24). Pese a que estas bacterias baciliformes no han sido caracterizadas en profundidad y que su papel es aún desconocido, se ha propuesto que podrían actuar como un indicador de una respuesta inmune innata diferente en la EC, capaces de inducir una mayor sensibilidad de la capa epitelial a las prolaminas, que podrían incluso ser confundidas por patógenos. De forma similar, Nadal et al (25) han descrito también la existencia de una mayor proporción de bacterias Gram-negativas en la microbiota duodenal de los pacientes con EC. En concreto, grupos de *Bacteroides* y *E. coli* estarían sobrerrepresentados en las biopsias de los pacientes con EC en actividad, comparado con los controles no-EC. Además, describieron una proporción disminuida entre bacterias beneficiosas (*Lactobacillus-Bifidobacterium*) y patógenas (*Bacteroides-E. coli*) en los pacientes con EC, tanto en actividad como en tratamiento, por oposición a los controles no-EC. Pese a que no podemos estar seguros de que la microbiota asociada a la EC descrita en ambos estudios posea la actividad gliadinasa, sí es sabido que algunas actividades metaloproteasas microbianas descritas en *Bacteroides* son capaces de conferir a estos microorganismos las características patógenas (19).

La microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica en el organismo humano, actuando en la digestión de componentes de la dieta, como polisacáridos complejos y, en menor medida, proteínas, entre las que se podría incluir el gluten. En el contexto de la EC, las bacterias que metabolizan la gliadina en el intestino podrían estar actuando como adyuvantes en el proceso patológico. Así, si estas bacterias exhibiesen alguna característica patogénica podrían disparar una respuesta inmune que estaría facilitada, además, por el aumento en la expresión de los receptores de la inmunidad innata de tipo *Toll-like* (TLRs) en la mucosa duodenal de los pacientes con EC (26). De esta forma, las células dendríticas podrían tomar muestras conjuntamente tanto de las bacterias adyuvantes específicas de EC como de los péptidos digeridos de gliadina, dando lugar a una reducción del umbral de respuesta necesario para *disparar* la respuesta inmune adaptativa (27) o, incluso, iniciar una respuesta completa frente al gluten secundario a un fenómeno de equivocación o *miss-match*. Otra posibilidad sería que los péptidos así generados por las gliadinasas bacterianas tuviesen una mayor afinidad por la hendidura de la molécula HLA-DQ2 o DQ8, o que incluso pudiesen absorberse más fácilmente y facilitar la respuesta inmune innata inespecífica mediada por la IL-15 en el duodeno de todos los individuos cuando entran en contacto con los péptidos de gliadina (28).



En consecuencia, los resultados presentados aquí apuntan a una posible estrategia terapéutica basada en la inhibición de la actividad gliadinasa en los pacientes con EC. En este contexto, la manipulación de forma dirigida de la composición de la flora duodenal mediante el uso de pre- y/o probióticos podría ayudar a restaurar el balance microbiano y, por tanto, a la inhibición de la actividad enzimática específica de la microbiota. Sin embargo, estos datos parecen estar en contradicción con las nuevas terapias alternativas a la DSG basadas en la suplementación oral con prolil-endopeptidasas para favorecer la digestión de la gliadina, si bien la verdadera utilidad *in vivo* de estas terapias es aun motivo de discusión (29-34).

En conclusión este estudio hemos caracterizado por primera vez, hasta nuestro conocimiento, un patrón de gliadinasas específico del duodeno de los pacientes con EC, que tiene naturaleza metaloproteasa y origen bacteriano. En consecuencia, y de acuerdo con las nuevas evidencias que señalan a una posible contribución bacteriana en el desarrollo de la EC, proponemos también que esta microflora asociada a la mucosa duodenal celíaca podría tener una implicación funcional en la patogénesis de la EC a través de la acción de estas gliadinasas. Esta implicación no sólo ofrece nuevas pistas en la patogénesis de la EC, sino que puede aportar también nuevas alternativas tanto profilácticas como terapéuticas al tratamiento actual de la DSG, que podrían implicar el uso de pro- y/o prebióticos para restaurar el balance microbiano en el duodeno, y su actividad metabólica, de una forma fiable, barata y segura.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet*. 1997 Jun 14;349(9067):1755-9
- 2 Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):647-55.
- 3 Carchon H, Serrus M, Eggermont E. Digestion of gliadin peptides by intestinal mucosa from control or coeliac children. *Digestion*. 1979;19(1):1-5.
- 4 Cornell HJ. Mucosal digestion studies of whole gliadin fractions in coeliac disease. *Ann Clin Biochem*. 1990 Jan;27 ( Pt 1):44-9.
- 5 Cornell HJ. Amino acid composition of peptides remaining after in vitro digestion of a gliadin sub-fraction with duodenal mucosa from patients with coeliac disease. *Clin Chim Acta*. 1988 Sep 15;176(3):279-89.
- 6 Cornell HJ, Auricchio RS, De Ritis G, De Vincenzi M, Maiuri L, Raia V, Silano V. Intestinal mucosa of celiacs in remission is unable to abolish toxicity of gliadin peptides on in vitro developing fetal rat intestine and cultured atrophic celiac mucosa. *Pediatr Res*. 1988 Aug;24(2):233-7.
- 7 Cornell HJ, Rivett DE. In vitro mucosal digestion of synthetic gliadin-derived peptides in celiac disease. *J Protein Chem*. 1995 Jul;14(5):335-9.
- 8 Cornell HJ. Partial in vitro digestion of active gliadin-related peptides in celiac disease. *J Protein Chem*. 1998 Nov;17(8):739-44.
- 9 Cornell HJ, Wills-Johnson G. Structure-activity relationships in celiac-toxic gliadin peptides. *Amino Acids*. 2001;21(3):243-53.
- 10 Bruce G, Woodley JF, Swan CH. Breakdown of gliadin peptides by intestinal brush borders from coeliac patients. *Gut*. 1984 Sep;25(9):919-24.
- 11 Frederiks WM, Mook OR. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J Histochem Cytochem*. 2004 Jun;52(6):711-22.
- 12 Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Nov;52(Pt 6):2141-6.
- 13 Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, Della Riccia DN, Bizzini F, Biagi F, Cifone MG, Corazza GR, Schuppan D. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest*. 2005 Mar;85(3):397-407.
- 14 Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D320-5. Epub 2007 Nov 8.
- 15 E. Arranz, J. Bode, K. Kingstone, A. Ferguson, Intestinal antibody pattern of celiac disease: association with gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential celiac disease, *Gut*, 35 (1994) 476-82.
- 16C. Camarero, P. Eiras, A. Asensio, F. Leon, F. Olivares, H. Escobar, G. Roy, Intraepithelial lymphocytes and celiac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry, *Acta Paediatr*. 89 (2000) 285-90.
- 17 S. Iltanen, K. Holm, M. Ashorn, T. Ruuska, P. Laippala, M. Maki, Changing jejunal gamma delta T cell receptor (TCR)-bearing intraepithelial lymphocyte density in celiac disease, *Clin. Exp. Immunol*. 117 (1999) 51-55.

*Digestión diferencial de la gliadina por la mucosa intestinal de los pacientes celíacos*

- 18 Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, Ullrich R. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with celiac disease. *Gut*. 1999 Jan;44(1):17-25.
- 19 Medina C, Santana A, Llopis M, Paz-Cabrera MC, Antolín M, Mourelle M, Guarner F, Vilaseca J, Gonzalez C, Salas A, Quintero E, Malagelada JR. Induction of colonic transmural inflammation by *Bacteroides fragilis*: implication of matrix metalloproteinases. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Feb;11(2):99-105.
- 20 Collado MC, Calabuig M, Sanz Y. Differences between the fecal microbiota of celiac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2007 Mar;8(1):9-14.
- 21 Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in celiac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Dec;51(3):562-8.
- 22 Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, Sundqvist T, Houlston R, Popat S, Norin E. Gut microflora associated characteristics in first-degree relatives of children with celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2007 Oct;42(10):1204-8.
- 23 Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G. High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in celiac patients with persistence of gastrointestinal symptoms after gluten withdrawal. *Am J Gastroenterol*. 2003 Apr;98(4):839-43.
- 24 Forsberg G, Fahlgren A, Hörstedt P, Hammarström S, Hernell O, Hammarström ML. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2004 May;99(5):894-904.
- 25 Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with celiac disease. *J Med Microbiol*. 2007 Dec;56(Pt 12):1669-74.
- 26 Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, Vásárhelyi B, Korponay-Szabó IR, Tulassay T, Arató A. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 Aug;45(2):187-93.
- 27 Sollid LM, Gray GM. A role for bacteria in celiac disease? *Am J Gastroenterol*. 2004 May;99(5):905-6.
- 28 Bernardo D, Garrote JA, Fernández-Salazar L, Riestra S, Arranz E. Is gliadin really safe for non-celiac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-celiac individuals challenged with gliadin peptides. *Gut*. 2007 Jun;56(6):889-90.
- 29 Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002 Sep 27;297(5590):2275-9.
- 30 Sollid LM, Khosla C. Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005 Mar;2(3):140-7.
- 31 Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L, Koning F. Efficient degradation of gluten by a prolyl endopeptidase in a gastrointestinal model: implications for celiac disease. *Gut*. 2008 Jan;57(1):25-32.
- 32 Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):696-707.
- 33 Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 2005 Sep;129(3):786-96.

## *CAPÍTULO VIII*

---

### *Digestión diferencial de la gliadina por la mucosa intestinal de los pacientes celíacos*

34 Cerf-Bensussan N, Matysiak-Budnik T, Cellier C, Heyman M. Oral proteases: a new approach to managing celiac disease. *Gut*. 2007 Feb;56(2):157-60.

# *CAPÍTULO IX*

## *INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA INNATA: ¿UN TRATAMIENTO BASADO EN ASCORBATO?*

*Manuscrito en preparación*



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC), es una hipersensibilidad del intestino delgado frente al trigo y otros cereales que contienen gluten (cebada, centeno y probablemente avena) en individuos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8) cuyo único tratamiento, es una dieta estricta sin gluten (DSG) de por vida (1,2). La inmunidad innata, y concretamente la IL-15 (3,4), juegan un papel clave en el desarrollo de la EC a través de un mecanismo DQ2-independiente (5), que induce un estrés epitelial, incremento de permeabilidad por alteración de las *tight-junctions*, apoptosis enterocitaria e incluso activación de las células dendríticas (CDs). Todo esto favorece el desencadenamiento de la segunda fase de la EC, una respuesta inmunológica adaptativa (6), caracterizada por la activación de células T reactivas al gluten que promueven un perfil TH1 de citocinas con predominio de IFN $\gamma$ .

La respuesta innata inducida por el gluten está mediada por IL-15 y es independiente del HLA-DQ2/8. Se desencadena a través un mecanismo dependiente de NF- $\kappa$ B (7), lo que establece un bucle de retroalimentación positiva ya que la IL-15 es a su vez un potente activador del NF- $\kappa$ B (8). Además NF- $\kappa$ B es también un mediador de numerosas respuestas innatas frente al gluten, como se ha observado en varios sistemas biológicos (9, 10, 11). Finalmente, las CDs, que son esenciales en la conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (12), requieren de la presencia de miembros de la familia NF- $\kappa$ B para su desarrollo, supervivencia, función y secreción de citocinas (13, 14, 15). En consecuencia, el NF- $\kappa$ B puede ser considerado también un factor central en la inmunopatogénesis de la EC.

El NF- $\kappa$ B es una colección heterogénea de dímeros formados por varias combinaciones de miembros de la familia de proteínas Rel, cuya ruta clásica de activación es requerida para la activación de las respuestas inmunes innatas, que además están sujetas a un complejo y estricto mecanismo regulador (16, 17). Recientemente se ha mostrado que la vitamina C (ascorbato) actúa como un inhibidor específico del NF- $\kappa$ B a concentraciones milimolares, como las que se alcanzan *in vivo* intracelularmente (18). Por tanto, el ascorbato podría ser un inhibidor potencial de la respuesta inmune innata a la gliadina en el duodeno celiaco, lo que podría convertirlo en una aproximación terapéutica complementaria a la DSG.

Para estudiar esta posibilidad, en este capítulo se expone los estudios realizados mediante cultivos de explantes duodenales, tanto en situación basal como

## CAPÍTULO IX

---

### *Inhibición de la respuesta innata: ¿Un tratamiento basado en ascorbato?*

estimulados con gliadina (con y sin suplementación de ascorbato 20mM). La inducción de IL-15 dependiente de gliadina fue bloqueada en todos los ensayos realizados, lo que abre nuevas posibilidades para valoración la administración del ascorbato como una posible alternativa terapéutica en la EC.



**MATERIAL Y MÉTODOS**

Se han estudiado 6 pacientes EC en DSG y 3 pacientes controles sanos no-EC. Todos los pacientes fueron recogidos entre los que se atendieron en los servicios de gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, y del Hospital Valle del Nalón de Asturias.

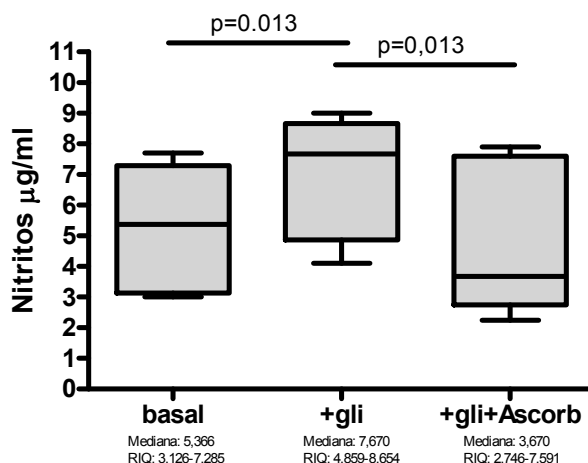
Se obtuvieron 3 explantes diferentes de cada paciente, que se cultivaron *in vitro*. Cada cultivo basal constituyó un control interno. Los otros 2 explantes fueron estimulados con una solución de gliadina 100µ/ml (SIGMA), con y sin la suplementación de ascorbato (SIGMA) 20mM, que es una concentración no tóxica pero altamente inhibidora del NF-κB (18). El estímulo únicamente fue mantenido durante 3 horas, tras las que los explantes fueron lavados con PBS (0,1% suplementado con gentamicina (Cambrex)), y transferidos a un nuevo medio de cultivo por otras 21 horas, para dar tiempo a la síntesis de IL-15. Tras 24 horas de cultivo, los explantes fueron embebidos en RNAlater y congelados hasta la extracción proteica. Se determinó la secreción de óxido nítrico en los sobrenadantes de cultivo a las 3 horas según la reacción de Griess para determinación de nitritos ya descrita. El total de los extractos completos de las biopsias cultivadas fueron evaluados para la producción de IL-15 (cargando 8µg de proteínas totales por gel). Como control positivo se usó IL-15 recombinante humana (Preprotech).

Los niveles de nitritos fueron estudiados tras aplicar una estadística no paramétrica pareada (tests de Friedman y de Wilcoxon pareado). El nivel de significación fue fijado en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Como se esperaba, la gliadina indujo la secreción de nitritos tras sólo 3 horas de estímulo en cultivo de los explantes de biopsia de pacientes EC en DSG (Figura IX.1).

Figura IX.1



Secreción de nitritos, tras 3 horas de cultivo, en los explantes de EC tratados con DSG tras un estímulo de gliadina (+gli, 100µg/ml) con y sin la suplementación de ascorbato (+gli+ascorb, 100µg/ml y 20mM respectivamente), comparado frente al cultivo basal. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (Test de Wilcoxon pareado,  $p < 0,05$ ; Test de Friedman,  $p = 0,0017$ ). Las barras horizontales representan las medianas. RIQ: rango intercuartil.

Dado que la inducción de iNOS (principal fuente de nitritos) es dependiente de NF- $\kappa$ B, el ascorbato se mostró como un inhibidor de la secreción de nitritos de forma que aquellos explantes así tratados retomaron los niveles basales de producción. Sin embargo, dado que el ascorbato es un potente antioxidante, y la reacción de Griess se basa en la determinación de nitritos, estos resultados podrían estar reflejando un artefacto experimental. En consecuencia, se evaluó la producción de IL-15.

Se encontró IL-15 basal sólo en un paciente EC tratado en DSG (1 de 6), mientras que no fue detectada en ninguno de los 3 paciente control no-EC (Figura IX.2). Como es sabido, el estímulo de gliadina indujo la producción de IL-15, la cual fue detectada incluso 21 horas después de retirar el estímulo en 4 de los 5 pacientes EC que no mostraban expresión basal de esta citocina. Resultados similares fueron encontrados en los pacientes control no-EC, donde la gliadina también indujo la producción de IL-15 (Figura IX.2).

Figura IX.2



Western-blot representativos de varios experimentos usando el extracto completo de los explantes duodenales tras 24 horas de cultivo basal (líneas 1 y 4), 3 horas de estímulo con gliadina (100µg/ml) y 21 horas en cultivo basal (líneas 2 y 5), y 3 horas de estímulo con gliadina suplementado con ascorbato (20mM) y 21 horas en cultivo basal (líneas 3 y 6) de un paciente EC en DSG (líneas 1-3) y de un paciente control no-EC (líneas 4-6).

La producción basal de IL-15 únicamente fue detectada en un paciente EC. La gliadina indujo la producción de IL-15 tanto en los pacientes EC (5 de 6) como en los controles no-EC (3 de 3). La adición de ascorbato bloqueó la producción de IL-15 en todos los casos, incluso en el único paciente con niveles basales de IL-15.

C: control positivo de IL-15

Si la hipótesis de la inhibición del NF- $\kappa$ B con ascorbato fuese verdad, su efecto debería manifestarse como una inhibición de la IL-15, ya que su inducción necesita del NF- $\kappa$ B. Es interesante señalar que ninguno de los explantes estimulados con gliadina y co-cultivado en presencia de ascorbato mostró niveles detectables de IL-15, lo que confirma su papel como inhibidor de la respuesta innata. Este efecto, fue encontrado también en los pacientes control no-EC, donde la gliadina indujo además la producción de IL-15. Finalmente, hay que resaltar el hecho de que el papel inhibidor del ascorbato tuvo lugar incluso en la única muestra que presentaba niveles basales de IL-15.

## **DISCUSIÓN**

En este capítulo se ha conseguido bloquear la inducción de la IL-15 por parte de la gliadina en el duodeno de los pacientes EC, lo cual es considerado como la primera etapa en la inmunopatogénesis de la enfermedad según el modelo de las 2 señales (6). Esta inhibición fue incluso patente en los individuos no-EC, donde la gliadina también parece ser un inductor inespecífico de la IL-15 (19). En este sentido, otro factor muy importante en los primeros pasos de la inmunopatogénesis, como es el estrés oxidativo inducido por iNOS a través del NF- $\kappa$ B, fue también inhibido con la adición de ascorbato al medio de cultivo.

Los miembros de la familia del NF- $\kappa$ B están sujetos a un complejo mecanismo regulador (16, 17). Este complejo implica la presencia de las proteínas inhibidoras I- $\kappa$ B, que se encuentran unidas a las subunidades del NF- $\kappa$ B, y de las que tienen que disociarse para ser activas. Esta disociación ocurre cuando los inductores del NF- $\kappa$ B fosforilan a las subunidades I- $\kappa$ B, quedando marcadas para su degradación por parte del proteasoma 26S (20), lo que libera a los dímeros del NF- $\kappa$ B que se pueden entonces translocar y realizar su función. La fosforilación del I- $\kappa$ B es derivada de dos quinasas de I- $\kappa$ B (IKKs), que son parte de otro complejo multiproteico (21). En este contexto, el ascorbato es capaz de inhibir la activación del IKK, lo que inhibe la fosforilación de I- $\kappa$ B y por tanto el NF- $\kappa$ B no se puede translocar y unirse a sus secuencias dianas en el DNA (18). Esta función inhibidora del ascorbato ha demostrado ser efectiva a concentraciones milimolares de hasta 20mM, tal como se encuentran intracelularmente *in vivo*. Además, el ascorbato no es tóxico a estas concentraciones para las células, ni inhibe otros factores inducibles como STAT1, ni interfiere con la capacidad de unión al DNA del NF- $\kappa$ B debido a las particularidades de su mecanismo (18).

Todos estos datos, en conjunto, apuntan a un posible papel terapéutico del ascorbato. Así, recientemente se ha descrito que una suplementación oral de ascorbato puede retrasar la progresión de una arterioesclerosis coronaria asociada a un trasplante (22), y que incluso consiguió reducir la hiperactivación de las células T inducida por cultivos xenobióticos (23). Además, el ascorbato también es capaz de inhibir la activación de las CD4 a la misma concentración no tóxica de 20mM, determinado tanto por incremento de expresión de marcadores de superficie, secreción de citocinas e incluso tras evaluar su capacidad inmunoestimuladora (24). De hecho, las CD4 así tratadas fueron incluso capaces de generar células T

reguladoras, con expresión de FoxP3 (24). Por tanto, es necesario realizar nuevos estudios que evalúen si el ascorbato es capaz también de inhibir la maduración de las CDs en el duodeno celiaco, o incluso si son capaces de generar células T reguladoras específicas de gliadina.

En resumen, en este capítulo el ascorbato ha sido descrito como un potente inhibidor de la respuesta inmune innata desencadenada por la gliadina. Así, la IL-15 inducida era completamente inhibida en presencia del ascorbato. Dicha inhibición tuvo lugar incluso en el único paciente que presentaba niveles basales de expresión de esta citocina, lo que confirma sus potentes propiedades inhibitorias. En consecuencia, el ascorbato se postula como una posible terapia alternativa a la DSG. Para ello, se debe profundizar en el mecanismo regulador en el que interviene el ascorbato, y específicamente se debería ampliar este estudio analizando la función inmunomoduladora de las CDs por parte del ascorbato en los pacientes EC. Todos estos datos podrían arrojar nueva luz en la posibilidad de un tratamiento seguro y barato de tipo alternativo y/o complementario a la DSG en la EC.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1 Maki M, Collin P. (1997) Celiac disease. *Lancet*. Jun 14;349(9067):1755-9
- 2 Sollid LM (2002) Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):647-55.
- 3 Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, et al. (2000) Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. Oct;119(4):996-1006.
- 4 Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease. *Lancet*. Jul 5;362(9377):30-7.
- 5 Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Sep;3(9):516-25.
- 6 Brandtzaeg P. (2006) The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett*. Jun 15;105(2):127-39.
- 7 Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, et al. (2003) Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. Sep;125(3):730-45.
- 8 McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils.
- 9 Maiuri MC, De Stefano D, Mele G, Iovine B, Bevilacqua MA, Greco L, Auricchio S, Carnuccio R. Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-gamma-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF-kappa B. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2003 Jul;368(1):63-71.
- 10 Jelinkova L, Tuckova L, Cinova J, et al. (2004) Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Lett*. Jul 30;571(1-3):81-5.
- 11 De Stefano D, Maiuri MC, Iovine B, Ialenti A, Bevilacqua MA, Carnuccio R. The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med*. 2006 Jan;84(1):65-74.
- 12 Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1373-81.
- 13 Quaaaz F.; Arron J.; Zheng Y.; Choi Y.; Beg (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kB subunits. *Immunity* 16: 257-270.
- 14 Speirs K, Lieberman L, Caamano J, Hunter CA, Scott P. Cutting edge: NF-kappa B2 is a negative regulator of dendritic cell function. *J Immunol*. 2004 Jan 15;172(2):752-6
- 15 Calder V.L.; Bondeson J.; Brennan F.M. ; Fowxell B.M.J. ; Feldmann M. (2003). Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kB
- 16 Ali S. & Mann D.A. (2004). Signal transduction via the NF-kB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell biochemistry and function* 22: 67-79.
- 17 Bonizzi G. & Karin M. (2004) The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *TRENDS in immunology* 25: 280-288
- 18 Bowie AG, O'Neill LA. Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):7180-8.

*Inhibición de la respuesta innata: ¿Un tratamiento basado en ascorbato?*

- 19 Bernardo D, Garrote JA, Fernández-Salazar L, et al. (2007) Is gliadin really safe for non-celiac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-celiac individuals challenged with gliadin peptides. *Gut*. Jun;56(6):889-90
- 20 Whiteside ST, Israël A. kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol*. 1997 Apr;8(2):75-82.
- 21 Zandi E, Karin M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I $\kappa$ B kinase complex *Mol Cell Biol*. 1999 Jul;19(7):4547-51
- 22 Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, Suh J, Frei B, Mudge GH, Selwyn AP, Ganz P. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet*. 2002 Mar 30;359(9312):1108-13
- 23 Weeks BS, Perez PP. A novel vitamin C preparation enhances neurite formation and fibroblast adhesion and reduces xenobiotic-induced T-cell hyperactivation. *Med Sci Monit*. 2007 Mar;13(3):BR51-8.ç
- 24 Tan PH, Sagoo P, Chan C, Yates JB, Campbell J, Beutelspacher SC, Foxwell BM, Lombardi G, George AJ. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):7633-44.





# *CAPÍTULO X*

## *DISCUSIÓN*



## RESUMEN

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han permitido validar la hipótesis de partida, según la cuál la gliadina es un activador inespecífico de la inmunidad innata como apuntan los datos publicados utilizando diversos modelos biológicos (1-16). Este efecto ha quedado confirmado no sólo al detectar la activación de linfocitos de la lámina propia obtenidos de explantes duodenales de pacientes control no Enfermos Celiacos (no-EC) estimulados con gliadina, sino porque se observó la inducción de IL-15 en estos mismos pacientes. Es interesante señalar que la IL-15 así inducida fue detectada también en los sobrenadantes de los cultivos, lo que descarta un almacenaje intracelular de esta citocina, y apunta a la inducción de una citocina biológicamente activa.

Una vez confirmada la hipótesis de partida, a lo largo de la Tesis nos planteamos alternativas para comprender por qué si la gliadina es un activador de la inmunidad innata, el desarrollo de la enteropatía no se observa en todos los individuos, o al menos en los HLA-DQ2/8 positivos. La explicación parece residir en que los individuos que desarrollan la EC presentan una serie de particularidades asociadas, como por ejemplo una mayor expresión basal de mediadores pro-inflamatorios (IFN $\gamma$  e iNOS) conjuntamente con una mayor densidad de receptores de IL-15. Estos factores parecen conferirles una mayor sensibilidad a dicha citocina. Adicionalmente, los pacientes que desarrollan la EC presentan un desbalance de células homeostáticas en el duodeno que se manifiesta por un déficit de expresión de la molécula reguladora FoxP3 asociada a las células T reguladoras (Treg), además de una mayor expresión de la molécula V $\alpha$ 24+, representativa de la población iNKT, que también correlaciona en los pacientes EC con el grado de la lesión histológica y con la mayor expresión de IFN $\gamma$ . Por el contrario, no se encontraron alteraciones en los niveles circulantes en sangre periférica de las células homeostáticas T $\gamma$  $\delta$ +, Treg e iNKT en los pacientes EC (pese a que estos últimos muestran una mayor proporción de células iNKT CD4+) que facilitasen el desencadenamiento de la inmunidad adaptativa en dichos pacientes. Por contra, en los pacientes con EC refractaria no respondedores a la dieta sin gluten (DSG), se encontraron niveles anormalmente reducidos de la población iNKT circulante.

Otra alternativa estudiada para tratar de comprender por qué no todos los individuos desarrollan la enteropatía tras la puesta en marcha de la respuesta innata fue estudiar la existencia o no de diferencias funcionales en los explantes

duodenales de los pacientes EC y controles no-EC a la hora de metabolizar la gliadina. Sorprendentemente, se encontró un patrón constituido por 7 bandas con actividad gliadinasa específico de los pacientes EC, que era independiente del estado de la mucosa y que estaba ausente en los pacientes no-EC. Este patrón parece además derivado de una flora microbiana diferente que coloniza el intestino delgado de los pacientes con EC. Estos resultados permiten especular que además de todos los factores genéticos conocidos implicados en la predisposición de la EC, estos pacientes necesitan tener otro factor ambiental microbiano para el desencadenamiento de la patología. De ser así, se abrirían puertas para el desarrollo de nuevas estrategias tanto profilácticas como terapéuticas basadas en el uso de pre/probióticos.

Finalmente, en esta Tesis Doctoral nos planteamos también dado el papel central que juega el NF- $\kappa$ B en la patogénesis celiaca, tanto en el contexto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, si su inhibición podría aportar una nueva alternativa terapéutica a la DSG. Los resultados obtenidos, aunque de forma muy preliminar, parecen señalar la potencial utilidad de un tratamiento basado en el ascorbato, que se ha mostrado capaz de bloquear completamente la respuesta inmune innata desencadenada por el gluten en el duodeno.

### **LA IL-15 JUEGA UN PAPEL INICIAL EN LA RESPUESTA CELIACA**

Los resultados obtenidos en el contexto de la IL-15 han confirmando datos previos obtenidos por nuestro grupo (17) donde no se detectaba IL-15 ni en los pacientes control no-EC, ni en los pacientes EC, tanto en actividad como tratados en DSG. Resultados similares han sido encontrados recientemente por otros grupos (A. Hernández, Comunicación personal, *Buenos Aires, I Simposio latinoamericano de Enfermedad Celiaca, 28-30 Junio 2007*), quedando por explicar el origen discrepancias con otros autores que sugieren que la IL-15 permanece elevada en los pacientes EC incluso tras el seguimiento de la DSG (18, 19). Es probable que el origen de las diferencias pueda estar en un seguimiento no adecuado de la DSG por parte de los pacientes incluidos en dichos estudios, donde pequeñas contaminaciones en la ingesta estarían induciendo la presencia de IL-15 en su intestino. Esta hipótesis tiene sentido al comprender que la IL-15 es una citocina de liberación muy rápida tras la presencia del antígeno desencadenante, como lo demuestra el hecho de haberse detectado incluso 3 horas después de la

estimulación antigénica en un modelo *ex vivo* utilizando explantes duodenales (20 y Figura IV.4b), mientras que una vez desencadenados los mecanismos de la inmunidad adaptativa, la inflamación queda bajo el control de otras citocinas, como la IL-18 o el IFN $\alpha$  (17, 21, 22). En conjunto, estos datos parecen confirmar que la IL-15 podría estar inducida por el gluten inmediatamente después de la ingesta, desapareciendo de la escena tras activar al sistema inmune adaptativo.

Queda sin embargo por entender por qué si todos los individuos responden induciendo la expresión de IL-15 tras la ingesta de gliadina, sólo los pacientes con EC desarrollan la enteropatía y no todos los portadores de los alelos de riesgo HLA-DQ2/8, como debería ocurrir de acuerdo al modelo de las dos señales. En la presente Tesis Doctoral, planteamos que la EC se desarrolla tras alcanzar un valor umbral de acumulación de factores de riesgo, donde el HLA-DQ2/8 sería el principal factor. Sin embargo, también sería posible desarrollar la EC en ausencia del HLA-DQ2/8 si se presentase el resto de los factores predisponentes.

### **¿POR QUÉ NO TODOS SOMOS CELIACOS?.**

Uno de los factores para entender por qué no todos los individuos son celíacos parece residir en el receptor de la IL-15 (IL15R $\alpha$ ). Dicho receptor es inducido por la IL-15, que en condiciones normales se encuentra ausente del intestino en todos los casos. Sin embargo, los pacientes con EC expresan de forma constitutiva niveles más elevados de IL15R $\alpha$ , incluso en aquellos tratados con DSG con serología negativa y sin ninguna alteración en la biopsia duodenal. Esto implica que la IL-15 inducida en picos en todos los individuos por igual tras la ingesta de gliadina podría ser más efectiva en los pacientes con EC, ya que en los individuos en los que no se expresa IL15R $\alpha$  de forma constitutiva, la IL-15 actuaría en la inducción del receptor (Figura V.4a), mientras que en los pacientes EC que ya expresan IL15R $\alpha$  podría ser biológicamente activa y de forma inmediata. Además, en estos individuos que expresan constitutivamente el receptor, la IL-15 sería magnificada ya que las células IL15R $\alpha$ <sup>+</sup> parece actuar como un reservorio de IL-15 al ir liberando poco a poco citocina libre al medio, lo que implica por tanto una mayor actividad biológica (23). En resumen, la mayor expresión del receptor facilita un microambiente rico en IL-15, que además magnificaría la respuesta en el intestino de los pacientes con EC.

Sin embargo, y como se observa en la Figura V.1, aproximadamente la mitad de los individuos control no-EC expresan constitutivamente el receptor de la IL-15 pese a que no todos desarrollan la enteropatía. En consecuencia, junto a la mayor densidad de IL15R $\alpha$  es necesario que coexistan otros factores predisponentes. La mayor expresión de moléculas pro-inflamatorias, como son iNOS y en especial IFN $\gamma$ , conjuntamente con una expresión menor de la molécula FoxP3 indicativa de un posible déficit de células reguladoras en la mucosa duodenal de los pacientes EC, podría contribuir también al desbalance inmune local en sentido pro-inflamatorio. Además, en la mucosa de los pacientes con EC se ha observado una mayor expresión de la molécula V $\alpha$ 24, representativa de la población iNKT, la cuál correlaciona tanto con la lesión histológica como con expresión de IFN $\gamma$ , lo que parece contribuir a la constitución de un microambiente inmune hiper-respondedor que facilita la magnificación de la respuesta innata.

### **CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA Y ENFERMEDAD CELIACA.**

Pese a que tradicionalmente se ha sugerido que el papel del IFN $\gamma$  en la inmunopatogénesis de la EC quedaba relegado a la lámina propia y la respuesta adaptativa, estudios recientes indican que los linfocitos intraepiteliales son una fuente importante de IFN $\gamma$  en la EC, en el contexto de la inmunidad innata (24, 25). Además, la producción de IFN $\gamma$  persistiría incluso tras el tratamiento con DSG, lo que encaja con los resultados aquí obtenidos. Es interesante el señalar que la mayor expresión de IFN $\gamma$  encontrada en los pacientes con EC, tanto en actividad como tratados en DSG, correlaciona con la de la molécula V $\alpha$ 24+, lo que sugiere que la población iNKT podría estar implicada en la liberación del IFN $\gamma$  en el contexto de la inmunidad innata y sin mediar la IL-12, perfil de citocinas que caracteriza la lesión celiaca (17, 21, 26).

Recientemente, Meresse et al (27) han caracterizado 40 genes expresados de forma diferencial entre los linfocitos intraepiteliales NKG2C+ y NKG2C-, de los que 19 estaban relacionados con un fenotipo y actividad NK junto a una regulación a la baja de su TCR. Este es un comportamiento característico de la población iNKT (28) y que ha sido sugerido en esta Tesis como posible explicación a la falta de activación encontrada en el compartimento intraepitelial tras el estímulo con gliadina. Todos estos datos, en conjunto, parecen apuntar a que esta población iNKT podría tener realmente un papel clave en la inmunopatogénesis celiaca, ya que además la

expresión de la molécula Vα24 correlaciona con el grado de lesión histológica en los pacientes con EC. La población de células iNKT, presumiblemente localizadas en el compartimento intraepitelial podrían ser por tanto clave en el desencadenamiento de la respuesta innata, ya que la IL-15 producida principalmente por los enterocitos tras la inducción por la gliadina (29) tendría no sólo un efecto mayor en los pacientes con EC debido a la mayor densidad de IL15Rα; sino que además podría activar directamente a los linfocitos iNKT intraepiteliales (30), que se encuentran aumentados en los pacientes EC. En conjunto, esto facilitaría la amplificación de la respuesta inmune capaz de desencadenar la inducción de una respuesta adaptativa secundaria en los pacientes EC.

Como ya se ha comentado antes, las células iNKT parecen ser muy importantes en la homeostasis inmunológica en general, y del intestino delgado en particular, debido a su capacidad de producir grandes cantidades de citocinas tanto de perfil TH1 y TH2 en breves periodos de tiempo posterior a su activación. El perfil tolerogénico (TH2) o pro-inflamatorio (TH1) por el que se decanta dicha población, depende de la fuerza de interacción entre la molécula CD1d presentadora y el ligando correspondiente, la existencia de señales co-estimuladoras en la célula presentadora de antígeno, y del perfil de citocinas en que tenga lugar la presentación (31). En condiciones normales, los propios enterocitos podrían actuar como células presentadoras de antígeno a la población de células iNKT intraepiteliales, en un ambiente no estresante y sin la expresión de señales co-estimuladoras por parte de los enterocitos. Dicha presentación induciría un perfil TH2 (28) que contribuiría a la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas capaces de inducir a su vez la expansión de células T reguladoras y, en definitiva, de los mecanismos de la tolerancia oral (32, 33, 34). Es sabido que la población de células Tγδ está también aumentada en los pacientes con EC, incluso tras el seguimiento de la DSG (35, 36). Hay que señalar que esta población parece ser importante en la inducción de la tolerancia oral debido a su posible implicación en la generación de células Treg (37, 38, 39). En consecuencia, parece obvio que cuando existe una alteración en la biología de dichas células pueden fallar los mecanismos de la tolerancia oral. Como es sabido, la expresión de la molécula MICA por parte de los enterocitos está implicada en la respuesta inmune innata frente al gluten (40, 41). Dicha molécula es además una diana de reconocimiento por parte de las células Tγδ (42, 43), muy abundantes en los linfocitos intraepiteliales en la EC (35, 36) que

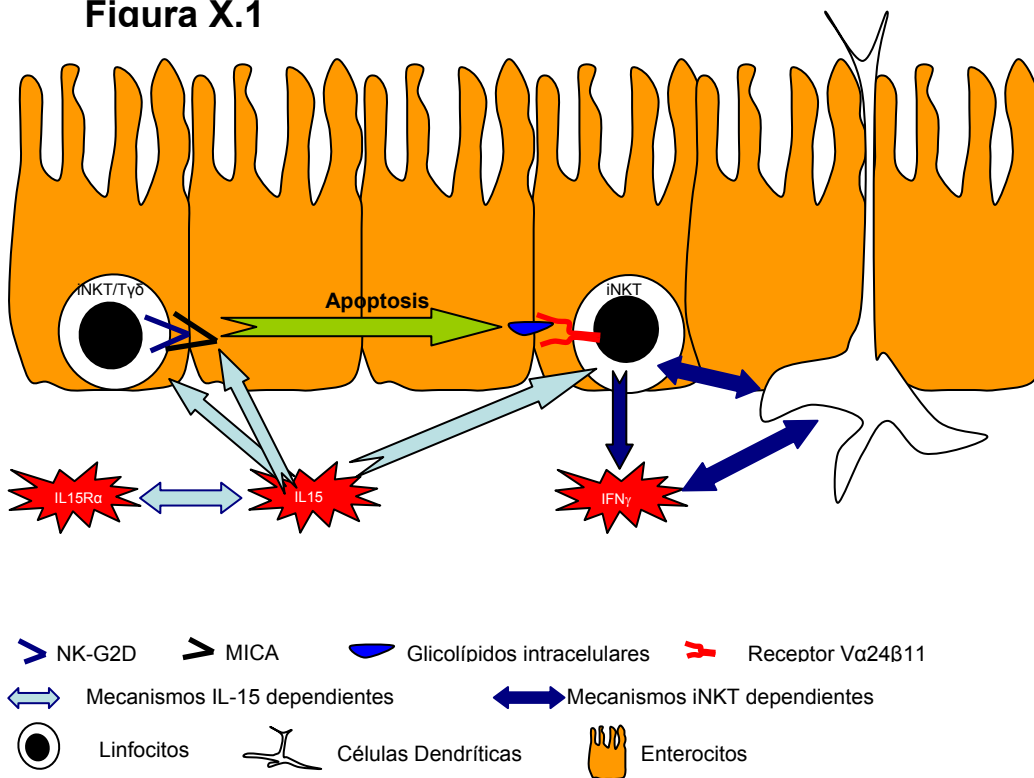
inducirán apoptosis sobre la población que la expresa, en este caso los enterocitos. Como se ha comentado, en la actualidad se considera que los ligandos naturales de la población iNKT son glicolípidos del citoplasma celular que únicamente podrían ser expresados en la matriz extracelular en el caso de apoptosis o necrosis, actuando así como un sensor que permitiría a dichas células detectar señales de estrés en el medio (32, 44). La IL-15 es además central en la activación y la función biológica de la población iNKT (30). Por tanto, esta citocina, tras su inducción por la gliadina, favorecería tanto la activación directa de la mayor densidad de células iNKT en el duodeno-EC, como la inducción de mecanismos de apoptosis de los enterocitos, mediada por las células  $T\gamma\delta$ , facilitando la salida de los “glicolípidos de peligro” intracelulares a la matriz extracelular. Dichos glicolípidos actuarían a su vez retroalimentando la activación de la población iNKT (32, 44), facilitando su diferenciación a células con un perfil TH1 productoras de grandes cantidades de IFN $\gamma$ . Además, este efecto se vería aumentado a su vez por la mayor expresión de células IL15R $\alpha$ +, que actuarían como reservorios intracelulares de IL-15 capaces de secretar la citocina de forma controlada a la matriz extracelular, y manteniendo así un ambiente inmunológico innato con expresión alta de IL-15 biológicamente activa (23) que facilitaría la magnificación de la respuesta inmune innata (Figura X.1)

Todas estas características podrían facilitar en los individuos susceptibles el desencadenamiento de la respuesta inmune adaptativa, verdadera efectora de la lesión celiaca. Dicha respuesta necesita de la activación de las Células Dendríticas específicas (CD) (45). Actualmente se sabe que las CDs juegan un papel muy importante como nexo de unión de la inmunidad innata y la adaptativa, madurando en respuesta a señales innatas para activar la respuesta adaptativa, y pudiendo ser activadas incluso por las propias células iNKT y  $T\gamma\delta$ + (42, 46) que están aumentadas en el compartimento intraepitelial de los pacientes con EC. Por tanto, cuando las CDs maduran mediante la interacción con las poblaciones de linfocitos iNKT y  $T\gamma\delta$ +, se diferenciarán hacia CDs pro-inflamatorias, donde por una parte co-estimularán de vuelta a los linfocitos del sistema inmune innato y, por otra, expandirán una respuesta de células T-específicas (42). De esta forma se rompe el ciclo normal de inducción de CDs tolerogénicas y se impide, por tanto, el desarrollo de la tolerancia oral a la gliadina. En consecuencia, el sistema caracterizado por una mayor expresión de células  $T\gamma\delta$  junto al aumento de la expresión de células iNKT-V $\alpha$ 24+ y del receptor de IL15 encontrado en los pacientes con EC, podría



contribuir en conjunto a magnificar cualquier tipo de respuesta inmunológica que se origine en el intestino de estos pacientes. Este fenotipo hiper-responder del intestino de los pacientes EC permitiría, a su vez, explicar la mayor expresión basal de mediadores pro-inflamatorios encontrados en el intestino de los pacientes EC (IFN $\gamma$  e iNOS), ya que cualquier tipo de señal de estrés o de activación inmunológica desencadenaría una mayor respuesta en el intestino celiaco (Figura X.1)

**Figura X.1**



**EL INTESTINO HIPER-RESPONDEDOR DE LOS PACIENTES CELIACOS:**

En condiciones normales y de ausencia de estrés, la población iNKT presenta un perfil de citocinas TH2, que facilita la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas y con ellas de los mecanismos de la tolerancia oral. Sin embargo, los pacientes con EC presentan una mayor densidad tanto de IL15Rα como de células iNKT y Tγδ, lo que podría contribuir a romper el perfil tolerogénico de dichas células.

La IL-15 inducida por igual en todos los individuos en respuesta a la gliadina, tendría un mayor efecto en los pacientes con EC facilitado por la mayor densidad de IL15Rα. La IL-15 activaría de forma directa la mayor densidad de linfocitos del sistema inmune innato (iNKT y Tγδ) encontrados en el compartimento intraepitelial de los pacientes EC induciendo la expresión de NK-G2D en su superficie. Además, el microambiente inmune rico en IL-15 también es una señal de estrés que induce la expresión de MICA en los enterocitos. En consecuencia, se facilita la apoptosis enterocitaria, y por tanto que los glicolípidos intracelulares de dichas células pueden ser detectados por las células iNKT en su receptor TCR invariante. La detección de su ligando natural conjunto a un microambiente pro-inflamatorio facilita la diferenciación de las células iNKT hacia un perfil TH1 con producción de grandes cantidades de IFNγ sin mediar IL-12. La activación TH1 de la población iNKT conjunto a un ambiente ya con presencia de IFNγ facilita la diferenciación de las células dendríticas hacia pro-inflamatorias, rompiéndose los mecanismos de la tolerancia oral.

## GENETICA DE LA EC.

Como se ha comentado anteriormente, la EC tiene un fuerte componente genético. Sin embargo, el heterodímero HLA-DQ2/8 parece aportar no más del 40% del riesgo genético, mientras que el otro 60% de susceptibilidad genética sería debida a la acción de numerosos genes de efecto menor. En este sentido, podría sugerirse que la EC se desarrolla tras alcanzar un valor umbral de acumulación de factores de riesgo, pudiendo desarrollarse la EC en ausencia del heterodímero HLA-DQ2/8 si se han acumulado el resto de los factores necesarios. Algunos de estos polimorfismos de efecto menor han sido descritos por nuestro grupo, como la presencia en heterocigosis del polimorfismo *CTLA4+49\*A/G* (47) probablemente derivado de la configuración en *trans* que implicaría para los genes CD28 e ICOS, también encuadrados dentro del *cluster CELIAC 3*. Otros polimorfismos también descritos por nuestro grupo señalan a una contribución del gen IL-6 en el desarrollo de la EC (48) con una contribución diferencial entre pacientes HLA-DQ2 positivos y negativos. Sin embargo, éstos no parecen ser los únicos genes contribuyentes, como lo demuestran numerosos estudios que han encontrado una asociación con otras moléculas del sistema inmune como MICA (49, 50), MICB (51, 52), HFSP70 (53), IFN $\gamma$  (54, 55) o TNF $\alpha$  (54)

No parece factible que vaya a encontrarse ningún otro gen con un efecto importante que contribuya al desarrollo de la EC. Por el contrario, parece lógico pensar que cualquier polimorfismo que pueda tener una implicación funcional en la respuesta inmune, o incluso en la integridad anatómico-funcional del intestino delgado, podría contribuir modestamente al desarrollo de la EC, además de otras muchas patologías con las que la molécula codificada comparta alguna característica. Entre este gran elenco de genes de efecto menor, podrían encontrarse polimorfismos que implicasen una mayor permeabilidad intestinal, mayor producción de citocinas proinflamatorias, déficit de citocinas reguladoras... etc., o en relación a los hallazgos de esta Tesis, una mayor densidad de receptores de IL-15, mayor proporción de células iNKT migradoras al duodeno o una menor proporción de células Treg, una mayor expresión de IFN $\gamma$  o INOS... etc. En definitiva factores que contribuyan a desarrollar un fenotipo hiper-responder desde el punto de vista inmunológico.

Es interesante señalar que cualquiera de estos fenotipos hiper-respondedores que confieran susceptibilidad a la EC, podrían también desarrollarse a partir de

numerosos genotipos diferentes, ya que todos estos factores están regulados por una compleja red de regulación. En consecuencia, la variación alélica responsable no tiene obligación de estar presente en la propia proteína efectora, sino que podría controlar su fenotipo final a partir de un polimorfismo implicado en la propia secuencia del promotor, o en fase previas (*up-stream*) en la regulación, como mediante variaciones en los factores de transcripción o incluso en las proteínas reguladoras (activadoras o inhibidoras) de dichos factores. Estos fenómenos, podrían hacer por tanto que un determinado polimorfismo pueda estar implicado o no en el desarrollo de la EC según la población a estudio, ya que el verdadero desencadenante sería el fenotipo, potencialmente alcanzado, a su vez, a partir de varios genotipos diferentes. Son así cada vez más numerosos los ejemplos en la literatura donde se encuentra que un mismo polimorfismo presenta resultados dispares de asociación según la población estudiada. En este sentido es interesante el hallazgo del polimorfismo en el gen MYO9B, que podría configurar susceptibilidad a la EC en la población neerlandesa (56), aunque esto ha sido descartado posteriormente en otras poblaciones, incluyendo la inglesa (57), la sueca (58), la noruega (58), la italiana (59), o la española (60).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apuntan a la existencia de otros factores desencadenantes implicados en el desarrollo de la EC. Dichos factores determinarían una expresión constitutiva mayor del receptor de la IL-15, junto a una expresión basal aumentada de diferentes mediadores pro-inflamatorios, como iNOS e IFN $\gamma$ . De igual manera, la mayor expresión de la molécula V $\alpha$ 24+ conjuntamente con la menor expresión de FoxP3, parece apuntar también a un desbalance de células homeostáticas en el intestino de los pacientes con EC. Todos estos elementos parecen ser factores constitutivos que caracterizan a la mucosa intestinal de los pacientes EC, ya que se encontraron también en los pacientes tratados en DSG, sin ninguna alteración histológica al momento de la toma de muestra y con serología negativa. Sin embargo, encontrar las bases genéticas que regulan dichos fenotipos puede ser una tarea compleja por los mecanismos previamente comentados. Es interesante señalar que todos estos factores parecen conferir una mayor condición pro-inflamatoria al intestino de los pacientes EC. En este sentido, se ha sugerido que los portadores del heterodímero HLA-DQ2/8 son los supervivientes de las grandes plagas que asolaron la humanidad, por lo que parece innegable que un fenotipo hiper-respondedor habría conferido una gran

ventaja evolutiva a sus portadores en un ambiente dominado por la existencia de varios agentes infecciosos. Sin embargo, y una vez dominado el ambiente por parte de los seres humanos, la posesión de un sistema inmune hiperactivo parece haberse vuelto en contra de sus portadores, que en este caso facilita el desarrollo de la EC. Es interesante el hecho de que dentro de la región HLA-II, el haplotipo ancestral 8.1 del HLA es compartido por un gran número de pacientes EC así como por pacientes afectados de otras enfermedades autoinmunes, dentro del cuál se encuentran inmersos entre otros el heterodímero HLA-DQ2 y el polimorfismo de efecto menor en la EC *TNF $\alpha$ -308\*A* (48), lo cuál apoya la hipótesis del fenotipo hiper-responder para la EC

### **FACTORES AMBIENTALES EN LA EC: ¿PODRÍAN SER IMPORTANTES LAS BACTERIAS?.**

Ninguno de los factores comentados hasta ahora permite discernir un claro riesgo para el desarrollo de la EC. Por el contrario, el déficit de células Treg, la sobre-expresión de células iNKT, la mayor condición pro-inflamatoria de forma basal o la densidad aumentada de IL15R $\alpha$  parecen ser co-factores que contribuyen en un mismo acervo genético como factores de efecto menor junto a la presencia del heterodímero HLA-DQ2 en el desarrollo de la EC. Dicha base genética se vería asimismo enriquecida por otros factores como por ejemplo una mayor permeabilidad trans-epitelial (61), que también favorecería el desencadenamiento de la respuesta adaptativa al favorecer el paso de los péptidos inmunodominantes hasta la lámina propia. No obstante, en esta Tesis Doctoral se ha identificado otro factor verdaderamente diferencial que permite identificar con más de un 90% de fiabilidad si el explante duodenal analizado proviene de un intestino de un paciente EC, tanto en actividad como en remisión, o por el contrario es de un paciente control no-EC. Este factor es la presencia en el extracto proteico intestinal de 7 bandas con actividad gliadinasas específicas de los pacientes EC, de naturaleza metaloproteasa y que podrían derivar de la actividad microbiana. Aunque con los datos aquí presentados no podemos estar seguros de que las diferentes poblaciones bacterianas recientemente descritas en el duodeno de pacientes EC (62, 63) sean las portadoras de estas gliadinasas, el que dichas actividades no se hayan revelado prácticamente en ningún individuo no-EC parece apuntar a que tanto dichas actividades enzimáticas como la población bacteriana que las portan puedan

participar en la patogénesis de la EC. Se ha identificado de esta forma uno de los posibles factores ambientales que contribuiría al desencadenamiento de la EC.

Hasta el momento se han sugerido otros factores ambientales predisponentes en la EC como la infección en niños con el adenovirus enterocitario humano 12, cuya proteína E1B tiene una secuencia homóloga de 12 aminoácidos a un péptido 12-mer de la gliadina y que podría favorecer una reacción cruzada (*miss-match*) y, con ello, el desencadenamiento de la enteropatía. Sin embargo, estudios a nivel molecular en los explantes duodenales de pacientes con EC no han encontrado evidencias a favor de la infección con dicho adenovirus 12 como factor predisponente en el desarrollo de la EC (64, 65).

En la actualidad se considera que el periodo de alimentación en la infancia podría jugar un papel ambiental en el desarrollo de la enteropatía, incluyéndose en este campo la edad de introducción del gluten en la dieta, así como la cantidad suministrada. Sin embargo, el principal papel parece ser debido al efecto protector que ejercería la lactancia materna (66, 67), pese a que dicho papel protector está en discusión, ya que podría retrasar la aparición de los síntomas de la EC en lugar de conferir una protección permanente y eficaz frente al gluten (68, 69). En conclusion, se necesitan estudios utilizando cohortes más amplias que permitan determinar si realmente la lactancia materna tiene un efecto protector o, por el contrario, enmascara los síntomas de la EC y dificulta el correcto diagnóstico de los niños.

## **NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPEUTICAS A LA EC**

La lactancia materna parece ejercer un efecto protector global en la salud de los neonatos protegiéndoles frente a agentes infecciosos (70, 71). Además, pese a que son necesarios otros factores ambientales, la lactancia materna contribuye en los neonatos al desarrollo de una flora microbiana intestinal rica en *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* (72, 73), precisamente la población de bacterias beneficiosas que se ha encontrado disminuida en los pacientes EC (63) por oposición a otras bacterias como *Bacteroides* y *E. coli*. Un factor que permitiría integrar toda esta información sería confirmar que las actividades gliadinasas derivaran de las poblaciones microbianas *Bacteroides* y *E. coli*, aumentadas en los pacientes con EC (63), que se verían favorecidas por un menor periodo de lactancia materna y la colonización inadecuada del intestino por parte de *Lactobacilli* y *Bifidobacterium*. Siendo conscientes de que queda aun por caracterizar la población bacteriana portadora de

las actividades gliadinasas, esta hipótesis permitiría comprender el aparente efecto protector de la lactancia materna en la prevención de la EC, además de ofrecer una posible nueva alternativa tanto profiláctica como terapéutica basada en el uso de preprobióticos con el fin de restaurar un balance microbiano duodenal adecuado y la inhibición de las actividades gliadinasas en el intestino.

Por otro lado, otra alternativa terapéutica, aunque no profiláctica, podría estar basada en la completa inhibición de la respuesta inmune innata inducida por la gliadina en el intestino de los pacientes con EC. Este bloqueo podría conseguirse mediante la co-administración de concentraciones adecuadas de ascorbato junto al gluten, para inhibir la activación del NF- $\kappa$ B y con él, la activación de la IL-15, necesaria para el desencadenamiento de toda la respuesta inmunológica en la EC. Sin embargo, dicha aproximación terapéutica se encuentra en una fase muy preliminar, y son necesarios muchos estudios para confirmar el verdadero papel inhibidor del ascorbato.

Por último, en relación con la EC refractaria, en esta Tesis Doctoral ha quedado también de manifiesto que dichos pacientes presentan una drástica disminución de los niveles circulantes de las células homeostáticas iNKT. Otra alternativa por tanto para su tratamiento podría ser la restauración de los niveles adecuados de dichas células homeostáticas, que estuviesen correctamente polarizadas hacia un perfil regulador (31) junto con la infusión de células Treg específicas de gliadina (74) para bloquear la respuesta de tipo autoinmune. Sin embargo, debido a la gravedad que implica la condición de EC refractaria parece que el tratamiento más seguro y fiable por el momento está basado en la utilización de fármacos inmunosupresores (75-77), y en el caso de la ECR tipo II quimioterapia e incluso trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (78). En ambos casos, se persigue bloquear la cronificación de la respuesta autoinmune y la mayor incidencia de malignificaciones asociadas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. Feb;52(2):218-23.
- 2 Sander GR, Cummins AG, et al.. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett*. 2005 Aug 29;579(21):4851-5.
- 3 Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, et al. (2006) Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. Apr;41(4):408-19.
- 4 Jelinkova L, Tuckova L, Cinova J, et al. (2004) Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Lett*. Jul 30;571(1-3):81-5.
- 5 Dolfini E, Elli L, Roncoroni L, et al. (2005) Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model. *World J Gastroenterol*. 2005 Oct 14;11(38):5973-7.
- 6 Nikulina M, Habich C, Flohe SB, et al. (2004) Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol*. Aug 1;173(3):1925-33.
- 7 Thomas KE, Sapone A, Fasano A, et al. (2006) Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2512-21.
- 8 Cinova J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, et al. (2007) Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol*. Mar;27(2):201-9. Epub 2007 Jan 27.
- 9 Hudson DA, Cornell HJ, Purdham DR, et al. (1976) Non-specific cytotoxicity of wheat gliadin components towards cultured human cells. *Lancet*. Feb 14;1(7955):339-41
- 10 Rocca E, Paganuzzi Stamatii A, et al. (1983) Effects of gliadin-derived peptides from bread and durum wheats on in vitro cultures of human cell lines. Implications for celiac disease pathogenesis. *Toxicol Lett*. May;16(3-4):331-8.
- 11 Dolfini E, Elli L, Dasdia T, et al. (2002) In vitro cytotoxic effect of bread wheat gliadin on the LoVo human adenocarcinoma cell line. *Toxicol In Vitro*. Aug;16(4):331-7.
- 12 Dolfini E, Elli L, Roncoroni L, et al. (2005) Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model. *World J Gastroenterol*. Oct 14;11(38):5973-7.
- 13 Giovannini C., Mancini E., E. De Vincenzi M. (1996) Inhibition of the cellular metabolism of Caco-2 cells by prolamin peptides from cereals toxic for celiacs. *Toxicology in Vitro* 10 (1996) 533-538
- 14 Giovannini C., Lechetti R., De Vincenzi M(1997) The activities of peptides "31 43", "44-55" and "56-68" of A-gliadin on in vitro cultures of CaCo-2 cells. *ATLA* 25, 437-443
- 15 Giovannini C, Sanchez M, Straface E, et al (2000) Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology*. 2000 Apr 7;145(1):63-71.
- 16 Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, et al. (2003) Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett*. Apr 10;540(1-3):117-24.
- 17 León AJ, Garrote JA, Blanco-Quirós A, Calvo C, Fernández-Salazar L, Del Villar A, Barrera A, Arranz E. Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2006 Dec;146(3):479-85.
- 18 Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, et al. (2000) Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. Oct;119(4):996-1006.



- 19 Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, et al. (2003) Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. Sep;125(3):730-45.
- 20 Bernardo D, Garrote JA, Fernández-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*. 2007 Jun;56(6):889-90.
- 21 Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Borrelli M, Staiano A, Auricchio S, Troncone R, Monteleone G. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut*. 2002 Feb;50(2):186-90
- 22 Di Sabatino A, Pickard KM, Gordon JN, Salvati V, Mazzarella G, Beattie RM, Vossenkaemper A, Rovedatti L, Leakey NA, Croft NM, Troncone R, Corazza GR, Stagg AJ, Monteleone G, MacDonald TT. Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007 Oct;133(4):1175-87.
- 23 Sato N, Patel HJ, Waldmann TA, et al. (2007) The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 9;104(2):588-93
- 24 Olausson RW, Johansen FE, Lundin KE, et al. (2002) Interferon-gamma-secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scand J Immunol*. Dec;56(6):652-64.
- 25 Forsberg G, Hernell O, Melgar S, et al. (2002) Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology*. Sep;123(3):667-78
- 26 Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):647-55.
- 27 Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee L, Tretiakova M, Semrad C, Kistner E, Winchester RJ, Braud V, Lanier LL, Geraghty DE, Green PH, Guandalini S, Jabri B. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1343-55.
- 28 Yu KO, Porcelli SA. (2005) The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett*. Aug 15;100(1):42-55.
- 29 Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. (2006) Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in celiac disease. *Gut*. Apr;55(4):469-77.
- 30 Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol*. 2005 Apr;79(7):4470-8.
- 31 van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Nishi N, Kolgen W, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. (2004) The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol*. Jul; 112(1):8-23.
- 32 Kim HJ, Hwang SJ, Kim BK, Jung KC, Chung DH. NKT cells play critical roles in the induction of oral tolerance by inducing regulatory T cells producing IL-10 and transforming growth factor beta, and by clonally deleting antigen-specific T cells. *Immunology*. 2006 May;118(1):101-11.
- 33 Roelofs-Haarhuis K, Wu X, Gleichmann E. Oral tolerance to nickel requires CD4+ invariant NKT cells for the infectious spread of tolerance and the induction of specific regulatory T cells. *Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):1043-50.

34 Chung Y, Chang WS, Kim S, Kang CY. NKT cell ligand alpha-galactosylceramide blocks the induction of oral tolerance by triggering dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 2004 Sep;34(9):2471-9.

35 Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. (1994) 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.* Apr;35(4):476-82.

36 Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H, Roy G. (2000) Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr.* Mar;89(3):285-90.

37 Thielke KH, Hoffmann-Moujahid A, Weisser C, Waldkirch E, Pabst R, Holtmeier W, Rothkotter HJ. (2003). Proliferating intestinal gamma/delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma/delta T cell pool in the peripheral blood. *Eur J Immunol.* Jun;33(6):1649-56.

38 Locke NR, Stankovic S, Funda DP, Harrison LC (2006) TCR gamma delta intraepithelial lymphocytes are required for self-tolerance. *Immunol.* Jun 1;176(11):6553-9.

39 Brandes M, Willmann K, Moser B. (2005) Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science.* Jul 8;309(5732):264-8.

40 Martín-Pagola A, Pérez-Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R, Preciado E, Castaño L, Bilbao JR. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics.* 2004 Nov;56(8):549-54.

41 Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity.* 2004 Sep;21(3):367-77.

42 Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 2005 Jul 18;202(2):203-7.

43 Zhao J, Huang J, Chen H, Cui L, He W. Vdelta1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: molecular and biochemical evidences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 6;339(1):232-40.

44 Ajuebor MN. Role of NKT cells in the digestive system. I. Invariant NKT cells and liver diseases: is there strength in numbers? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Oct;293(4):G651-6.

45 Ráki M, Tollefsen S, Molberg Ø, Lundin KE, Sollid LM, Jahnsen FL. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology.* 2006 Aug;131(2):428-38.

46 Campos-Martín Y, Colmenares M, Gozalbo-López B, López-Núñez M, Savage PB, Martínez-Naves E. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytolysis but are efficiently recognized by NKT cells. *J Immunol.* 2006 May 15;176(10):6172-9.

47 Bernardo; E. Gómez; AJ. León; A. Antelo; C. Calvo; E. Arranz; JA. Garrote. Polimorfismo CTLA4+49 en la Enfermedad Celiaca ¿Una asociación en heterocigosis? *Química Clínica* 2007;26(1):15-9.

48 JA. Garrote, E. Arranz, E. Gómez-González, AJ. León, C. Farré, C. Calvo, D. Bernardo, Fernández-Salazar L, A. Blanco-Quirós. IL6, IL10 and TGFb gene polymorphisms in celiac disease: differences between DQ2 positive and negative patients. *Allergol et Immunopathol* 2005; 33(5):245-9.

49 Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics.* 2002 Feb;53(10-11):989-91.

- 50 Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201.
- 51 González S, Rodrigo L, López-Vázquez A, Fuentes D, Agudo-Ibáñez L, Rodríguez-Rodero S, Fdez-Morera JL, Martínez-Borra J, López-Larrea C. Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2004 Apr;99(4):676-80.
- 52 Rodriguez-Rodero S, Rodrigo L, Fdez-Morera JL, Martinez-Borra J, Lopez-Vázquez A, Fuentes D, Lopez-Arbesu R, Lopez-Soto A, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MHC class I chain-related gene B promoter polymorphisms and celiac disease. *Hum Immunol*. 2006 Mar;67(3):208-14.
- 53 Ramos-Arroyo MA, Feijó E, Sánchez-Valverde F, Aranburu E, Irisarri N, Olivera JE, Valiente A. Heat-shock protein 70-1 and HLA class II gene polymorphisms associated with celiac disease susceptibility in Navarra (Spain). *Hum Immunol*. 2001 Aug;62(8):821-5.
- 54 Lio D, Scola L, Forte GI, Accomando S, Giacalone A, Crivello A, Cataldo F. TNFalpha, IFNgamma and IL-10 gene polymorphisms in a sample of Sicilian patients with coeliac disease. *Dig Liver Dis*. 2005 Oct;37(10):756-60.
- 55 Rueda B, Martínez A, López-Nevot MA, Mas-Fontao A, Paco L, Ortega E, Fernández-Arquero M, Urcelay E, Gomez de la Concha E, Martín J. A functional variant of IFNgamma gene is associated with coeliac disease. *Genes Immun*. 2004 Sep;5(6):517-9.
- 56 Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zhernakova A, Bevova MR, Strengman E, Franke L, van't Slot R, van Belzen MJ, Lavrijsen IC, Diosdado B, Daly MJ, Mulder CJ, Mearin ML, Meijer JW, Meijer GA, van Oort E, Wapenaar MC, Koeleman BP, Wijmenga C. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet*. 2005 Dec;37(12):1341-4.
- 57 Hunt KA, Monsuur AJ, McArdle WL, Kumar PJ, Travis SP, Walters JR, Jewell DP, Strachan DP, Playford RJ, Wijmenga C, van Heel DA. Lack of association of MYO9B genetic variants with coeliac disease in a British cohort. *Gut*. 2006 Jul;55(7):969-72.
- 58 Amundsen SS, Monsuur AJ, Wapenaar MC, Lie BA, Ek J, Gudjónsdóttir AH, Ascher H, Wijmenga C, Sollid LM. Association analysis of MYO9B gene polymorphisms with celiac disease in a Swedish/Norwegian cohort. *Hum Immunol*. 2006 Apr-May;67(4-5):341-5.
- 59 Cirillo G, Di Domenico MR, Corsi I, Gagliardo T, Del Giudice EM, Perrone L, Tolone C. Do MYO9B genetic variants predispose to coeliac disease? An association study in a cohort of South Italian children. *Dig Liver Dis*. 2007 Mar;39(3):228-31.
- 60 Núñez C, Márquez A, Varadé J, Martínez A, Polanco I, Maluenda C, Fernández-Arquero M, de la Concha EG, Urcelay E. No evidence of association of the MYO9B polymorphisms with celiac disease in the Spanish population. *Tissue Antigens*. 2006 Dec;68(6):489-92.
- 61 Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 2000 Apr 29;355(9214):1518-9.
- 62 Forsberg G, Fahlgren A, Hörstedt P, Hammarström S, Hernell O, Hammarström ML. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2004 May;99(5):894-904.
- 63 Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease.

## *CAPÍTULO X*

---

### *Discusión*

64 Handley J, O'Neill H, Connolly J, Burrows D. Adenovirus 12 and dermatitis herpetiformis. *Acta Derm Venereol.* 1993 Dec;73(6):430-2.

65 Lawler M, Humphries P, O'Farrelly C, Hoey H, Sheils O, Jeffers M, O'Briain DS, Kelleher D. Adenovirus 12 E1A gene detection by polymerase chain reaction in both the normal and coeliac duodenum. *Gut.* 1994 Sep;35(9):1226-32.

66 Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, Dannaeus A, Lindberg T, Lindquist B, Stenhammar L, Hernell O. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr.* 2000 Feb;89(2):165-71.

67 Ivarsson A, Persson LA, Hernell O. Does breast-feeding affect the risk for coeliac disease? *Adv Exp Med Biol.* 2000;478:139-49.

68 Nash S. Does exclusive breast-feeding reduce the risk of coeliac disease in children? *Br J Community Nurs.* 2003 Mar;8(3):127-32.

69 Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child.* 2006 Jan;91(1):39-43.

70 Wold AE, Adlerberth I. Breast feeding and the intestinal microflora of the infant--implications for protection against infectious diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2000;478:77-93.

71 Dai D, Walker WA. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv Pediatr.* 1999;46:353-82.

72 Martín R, Heilig GH, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol.* 2007 Dec;103(6):2638-44.

73 Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl.* 2003 Sep;91(441):48-55.

74 Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol.* 2006 Sep 15;177(6):4178-86.

75 Goerres MS, Meijer JW, Wahab PJ, Kerckhaert JA, Groenen PJ, Van Krieken JH, Mulder CJ. (2003) Azathioprine and prednisone combination therapy in refractory coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* Sep 1;18(5):487-94.

76 Vivas S, Ruiz de Morales JM, Ramos F, Suarez-Vilela D. (2006) Infliximab in refractory coeliac disease. *N Engl J Med.* Jun 8;354(23):2514-5.

77 Al-Toma A, Goerres MS, Meijer JW, von Blomberg BM, Wahab PJ, Kerckhaert JA, Mulder CJ. (2006) Cladribine therapy in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Clin Gastroenterol Hepatol.* Nov;4(11):1322-7

78 Al-toma A, Visser OJ, van Roessel HM, von Blomberg BM, Verbeek WH, Scholten PE, Ossenkoppele GJ, Huijgens PC, Mulder CJ. (2007) Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Blood.* Mar 1;109(5):2243-9

# *CAPÍTULO XI*

## *CONCLUSIONES*



De acuerdo a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, podemos enunciar las siguientes conclusiones:

- 1) En condiciones basales, tanto los explantes duodenales de los pacientes con EC, tratados en DSG, como de los controles no-EC, no expresan niveles detectable de IL-15.
- 2) La gliadina parece ser un activador inespecífico de la inmunidad innata en el intestino de todos los individuos, que se manifiesta tanto por activación de CD30 dependiente de IL-15 en los linfocitos de lámina propia; como por la inducción de IL-15 tras el estímulo de gliadina tanto en los pacientes EC en DSG como en individuos control no-EC. Los mediadores de la inmunidad adaptativa, por el contrario, se modifican tras el estímulo con gliadina únicamente en los pacientes EC tratados en DSG.
- 3) El péptido inmunodominante 33-mer ejerce también un efecto tóxico directo en el intestino de todos los individuos, al inducir la expresión de IL-15 en la mayoría de los casos.
- 4) La IL-15 inducida por la gliadina, tanto en los pacientes EC tratados en DSG como en los controles no-EC, no permanece en el compartimento intracelular sino que es secretada al medio extracelular.
- 5) Los pacientes EC tanto en actividad como tratados en DSG, presentan una mayor densidad de IL15R $\alpha$  en la mucosa duodenal, comparado con los individuos control no-EC.
- 6) Los pacientes EC tratados en DSG, presentan una mayor condición pro-inflamatoria de forma basal, determinado mediante la mayor carga del mRNA tanto de iNOS como de IFN $\gamma$ , pese a la completa normalización de la histología mucosa y la serología negativa.
- 7) El intestino EC tratado en DSG presenta un menor umbral de respuesta frente a un estímulo de IL-15, determinado mediante secreción aumentada de nitritos e IFN $\gamma$ , comparado con los individuos control no-EC.
- 8) La respuesta innata activada por la gliadina en los pacientes EC, determinada tanto por inducción de IL-15 como por aumento en la secreción de nitritos, es bloqueada completamente por la administración de concentraciones no tóxicas de 20mM de ascorbato junto al estímulo.

- 9) Las poblaciones de células homeostáticas circulantes Treg,  $T\gamma\delta^+$  e iNKT no se encuentran modificadas en los pacientes EC, tanto tratados como en actividad.
- 10) La población de células iNKT circulantes va disminuyendo conforme aumenta la edad, tanto en los pacientes EC como en los individuos control no-EC.
- 11) Los pacientes con EC Refractaria, presentan niveles disminuidos de células iNKT circulantes, por oposición a los pacientes que responden a la DSG. Por el contrario, los niveles de las poblaciones Treg y  $T\gamma\delta^+$  circulantes no se ven afectadas por dicha condición.
- 12) La disminución de células iNKT circulantes en los pacientes con EC Refractaria no se correlaciona con el porcentaje de células intraepiteliales aberrantes ni con el desarrollo de un linfoma asociado a las células T intestinales.
- 13) Los pacientes EC tratados en DSG, presentan mayores niveles de células iNKT CD4+ comparados con los individuos control no-EC.
- 14) En condiciones basales, la población de células iNKT circulante no expresa las moléculas reguladoras FoxP3 ni CTLA4 en su citoplasma.
- 15) Los pacientes EC presentan una mayor expresión de la molécula  $V\alpha 24$  en el duodeno, por oposición a los controles sanos no-EC. Además, los pacientes EC en actividad presentan incrementada dicha molécula frente a los pacientes EC tratados en DSG.
- 16) Los pacientes EC, tanto en actividad como tratados en DSG, presentan menores niveles de expresión de la molécula FoxP3 en el duodeno, junto a con un ratio  $V\alpha 24$ /FoxP3 aumentado.
- 17) La expresión de la molécula  $V\alpha 24$  en el intestino EC correlaciona con la expresión de IFN $\gamma$  encontrada en esos mismos pacientes, y con el grado de lesión histológica observada.
- 18) El intestino de los pacientes con EC, tanto en actividad como tratados en DSG, presenta un patrón de 7 bandas con actividad gliadinasas que no aparece en los individuos control no-EC.
- 19) Se ha descartado el origen leucocitario de dichas actividades gliadinasas, de naturaleza metaloproteasa, que sin embargo parecen tener un origen bacteriano.



# *CAPÍTULO XII*

## *ANEXOS*



**CURRÍCULUM DEL AUTOR:** David Bernardo Ordiz

**FORMACIÓN ACADÉMICA:**

- Licenciado en Biología (especialidad Fundamental y Biotecnología), Universidad de Oviedo, 2002.
- Diploma de Estudios Avanzados (DEA), Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, 2005.
- Experto Universitario en Métodos Avanzados de Estadística Aplicada y Métodos Robustos y de Remuestreo, UNED, 2007.

**FORMACIÓN COMPLEMENTARIA:**

- Curso de extensión universitaria “Riesgos y precauciones en los laboratorios” (45 horas). Universidad de Oviedo, 2001.
- Certificado de Aptitud Pedagógica, Universidad de Oviedo, 2003.
- Ciclo Elemental de Inglés. Escuela Oficial de Idiomas, Oviedo, 2004.

**ACTIVIDADES DE CARÁCTER CIENTÍFICO O PROFESIONAL**

- Alumno Interno-Becario de Colaboración del MEC. Laboratorio de Genética Acuícola, Área de Genética, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. Septiembre 2001-Junio 2002
- Alumno en Prácticas de la Universidad de Oviedo. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA-INIA). Julio 2002-Septiembre 2002
- Investigador Pre-doctoral (Becario FPU). Laboratorio de Genética Acuícola, Área de Genética, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. Octubre 2002-Diciembre 2004
- Investigador Pre-doctoral. Laboratorio de Inmunología de las Mucosas, Departamento de Pediatría e Inmunología, Universidad de Valladolid. Desde Enero 2005.

**ESTANCIAS EN CENTROS EXTRANJEROS**

- Laboratorio de Inmunología Clínica, Departamento de Patología, Centro Médico de la Universidad Libre de Ámsterdam. Febrero 2006-Junio 2006.

**PROYECTOS**

- 13 Proyectos de Investigación, incluyendo 2 Proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III y 3 Proyectos financiados por la Junta de Castilla y León.

**PRESENTACIONES EN CONGRESOS**

- Presentaciones en póster en 4 Congresos Nacionales y 9 Congresos Internacionales.
- Presentaciones orales en 1 Congreso Nacional y 2 Congresos Internacionales.

## PUBLICACIONES:

### GENÉTICA DE POBLACIONES Y DE LA CONSERVACIÓN

- J.A. Piñera, **D. Bernardo**, G. Blanco, E. Vázquez, J.A. Sánchez. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Ecology Notes* (2006) 6, 33–35
- Jorge A. Piñera, **David Bernardo**, Gloria Blanco, Emilia Vázquez, José A. Sánchez. Usefulness of microsatellite markers developed from *Pagellus bogaraveo* to genetically study five different species of Sparidae. *Marine Ecology- and evolutionary perspective*. 2007 Sept, 28 (s1), 184–187.
- Yaisel J. Borrell, Carlos E. Carleos, Juan F. Asturiano, **David Bernardo**, Emilia Vázquez, Norberto Corral, Jose A. Sánchez, Gloria Blanco. Use of microsatellites and a combinatorial optimization approach in the acquisition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstocks for hatcheries. *Aquaculture* 2007, 269 (1-4): 200-210.
- Yaisel Juan Borrell, **David Bernardo**, Gloria Blanco, Emilia Vázquez, José Antonio Sánchez. Spatial and temporal variation of genetic diversity and estimation of effective population sizes in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) populations from Asturias (Northern Spain) using microsatellites. *Conservation Genetics*. EN PRENSA.

### INMUNOGENÉTICA

- Garrote, J.A.; Arranz, E.; Gómez-González, E.; León, A.J.; Farré, C.; Calvo, C.; **Bernardo, D.**; Fernández-Salazar, L.; Blanco-Quirós, A. IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in coeliac disease: differences between DQ2 positive and negative patients. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2005 Sep-Oct;33(5):245-9.
- **Bernardo, D.**; Gómez-González, E.; León, A.J.; Antelo, A.; Calvo, C.; Arranz, E.; Garrote, J.A. Polimorfismo CTLA4+49 en la Enfermedad Celiaca: ¿Una asociación en heterocigosis? *Química Clínica* 2007 26 (1): 15-9
- Rodrigo L, Martínez-Borra J, Garrote JA, Niño P, León AJ, Riestra V, **Bernardo D**, Barreiro M, Arranz E. CARD15 mutations are poorly related to Crohn's disease phenotypes in Asturias *Rev Esp Enferm Dig*. 2007 Oct;99(10):570-757

### INMUNOLOGÍA DEL TRACTO RESPIRATORIO

- J. F. Bermejo-Martin, **D. Bernardo**, Marta Dominguez-Gil, Ana Alonso, M. C. Garcia-Arevalo, M. Pino, R. Ortiz de Lejarazu, J. M<sup>a</sup> Eiros, J. Ardura, A. J. León, J.A. Garrote, S. Resino, A. Blanco-Quirós, M<sup>a</sup>. A. Muñoz-Fernández, E. Arranz. IL-1b, IL-8, IL-6 in nasal secretions : a common role of the innate immunity in viral bronchial infections in infants ? *Br J Biomed Sci*. 2006;63(4):173-5.
- Jesus F. Bermejo-Martin; Ana Alonso; Maria Carmen Garcia-Arevalo; Raul Ortiz De Lejarazu; Maria Pino; Salvador Resino; Alberto Tenorio; **David Bernardo**; Alberto J Leon; Jose A

Garrote; Julio Ardura; Marta Dominguez-Gil; Jose M Eiros; Alfredo Blanco-Quiros; David J Kelvin; Maria Angeles Munoz-Fernandez; Eduardo Arranz. Persistence of proinflammatory response after severe respiratory syncytial virus disease in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun;119(6):1547-50.

- Jesus F. Bermejo-Martin, Maria C. Garcia-Arevalo, Raul Ortiz De Lejarazu, Julio Ardura, Jose M. Eiros, Ana Alonso, Vanesa Matías, Maria Pino, **David Bernardo**, Eduardo Arranz, Alfredo Blanco-Quiros. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at mucosal level during severe Respiratory Syncytial Virus infection in children. *Eur Cytokine Netw.* 2007 Sep;18(3):162-7.

#### ENFERMEDAD CELIACA

- **Bernardo, D.**; Garrote, J.A.; Fernández-Salazar, L.; Riestra, S.; Arranz, E. Is gliadin really safe for non-coeliac individuals? IL-15 production in biopsy culture from non coeliacs challenged with gliadin peptides *Gut.* 2007 Jun;56(6):889-90
- **David Bernardo**, Ingrid M.W. van Hoogstraten, Wieke H.M. Verbeek, A. Salvador Peña, M. Luisa Mearin, Eduardo Arranz, José Antonio Garrote, Rik J. Scheper, Marco W.J. Schreurs, Hetty J. Bontkes, Chris J.J. Mulder, B. Mary E. von Blomberg Decreased circulating iNKT cell numbers in Refractory Coeliac Disease. *Clin Immunol.* 2008 Feb;126(2):172-9.
- José A. Garrote, Emma Gómez, Alberto J. León, **David Bernardo**, Carmen Calvo, Luis Fernández-Salazar, Alfredo Blanco-Quirós, Eduardo Arranz. Cytokine, chemokine and immune activation pathway profiles in Celiac Disease: An immune system activity screening by expression macroarrays. *Drug Target Insight.* EN PRENSA
- Eduardo Arranz, **David Bernardo**, José Antonio Garrote. El sistema inmune del tracto digestivo y mecanismos de inflamación. Capítulo de Tratado de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (Ed. Ergón). EN PRENSA

#### MÉRITOS

##### DOCENTES

- Docente del curso “Fundamentos y aplicaciones de técnicas de biología molecular”, organizado por la Asociación Española de Técnicos de Laboratorio y el “Hospital Universitario Río Hortega” (2005).
- Docente del curso titulado “La genómica: una herramienta diagnóstica en el laboratorio clínico”, organizado por la Dirección de Enfermería, Área de Formación Continuada y el “Hospital Clínico Universitario de Valladolid” (2007).

##### PREMIOS

- Mención de Calidad (4º puesto) en el 2º Premio Nacional Carrefour de Medio Ambiente por el estudio: “Uso de loci microsatélites en la estimación del tamaño efectivo en poblaciones naturales de salmón atlántico”. 2004.

- Premio Nutribén por el proyecto: “Mecanismos de inmunopatogénesis y marcadores inmunológicos de severidad en la infección pediátrica por virus respiratorio sincitial. Posible papel de inmunomoduladores en su tratamiento”. 2005
- Accésit (2º puesto) del III Premio de Investigación sobre la Enfermedad Celiaca Convocado por la asociación de Celiacos de Madrid por el proyecto: “Patrones de expresión génica en el intestino de pacientes con enfermedad celiaca. Estudios de estimulación con gliadina y estrategias de inmunomodulación en un modelo de cultivo de biopsia”. 2005
- Premio mejor comunicación en el XXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, por el “Estudio del polimorfismo en posición +49 del gen CTLA4 en la Enfermedad Celiaca. 2005.
- Accésit (2º puesto) del IV Premio de Investigación sobre la Enfermedad Celiaca Convocado por la asociación de Celiacos de Madrid por el proyecto: “Células Dendríticas como reguladoras de la inmunidad intestinal. Estrategias de inmunomodulación para desconectar la respuesta inespecífica y general al gluten de la respuesta adaptativa exclusiva en los pacientes celiacos”. 2006.
- Premio de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria y Castilla y León por el Proyecto “Respuesta inmune a VRS en niños menores de 2 años. Factores implicados en mal pronóstico y evolución a Asma”. 2007.
- Accésit en el Premio de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid por el proyecto: “Estudio de los patrones inmunológicos de respuesta a virus respiratorio sincitial en niños con bronquiolitis aguda. Implicaciones en la fisiopatogenia de la enfermedad. 2007
- V Premio de Investigación sobre la Enfermedad Celiaca Convocado por la asociación de Celiacos de Madrid por el proyecto: “Expresión del receptor de la IL-15 en el intestino celiaco y su posible papel como conexión entre la inmunidad innata y adaptativa al gluten: implicaciones en la pérdida de tolerancia oral. 2007.

#### OTROS MERITOS

- Socio Fundador de la Sociedad Española de Enfermedad Celiaca (SEEC)











YOU CAN BE ANYTHING YOU WANT TO BE, JUST TURN YOURSELF  
INTO ANYTHING YOU THINK THAT YOU COULD EVER BE.

-FREDDIE MERCURY-

